

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Monika ŠTIMAC

**OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE ZA
BARVANJE KRVNIH ŽIL V MIŠJIH TUMORSKIH
MODELIH**

Magistrsko delo
(Magistrski študij - 2. stopnja)

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Monika ŠTIMAC

**OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE ZA BARVANJE
KRVNIH ŽIL V MIŠJIH TUMORSKIH MODELIH**

magistrsko delo

**OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHOD FOR BLOOD
VESSELS STAINING IN MOUSE TUMOR MODELS**

M. Sc. Thesis
(Master study Programmes)

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje, molekulske biologije. Opravljeno je bilo na Fakulteti za vede o zdravju v Izoli, Univerza na Primorskem ter na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Majo Čemažar (OI) ter za recenzenta prof. dr. Roka Kostanjška.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina Sepčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Maja Čemažar
Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Monika Štimac

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	6:576.385.5(043.2)=163.6
KG	krvne žile/tumorji/miši/IHC/siRNA
AV	ŠTIMAC, Monika
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentor)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	OPTIMIZACIJA IN VALIDACIJA METODE ZA BARVANJE KRVNIH ŽIL V MIŠJIH TUMORSKIH MODELIH
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 57 str., 2 pregl., 27 sl., 0 pril., 94 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Med različne načine zdravljenja raka se uvršča antiangiogena terapija, ki sloni na preprečevanju rasti tumorskega žilja. Endoglin (CD105) je pomožni receptor transformirajočega rastnega faktorja β (TGF- β) in sodeluje pri aktivaciji signalne poti z vplivom na proliferacijo in migracijo endotelijskih celic pri angiogenem tumorskem ožiljenju. Prav tako se povečano izraža v endotelijskih celicah tumorskih žil in služi tudi kot prognostični dejavnik številnih tumorjev (želodca, črevesja, dojk, kože ipd.). Namen naše raziskave je bil razviti in optimizirati imunohistokemično (IHC) metodo, ki bi služila barvanju tumorskih žil in bi posledično bila uporabna za ovrednotenje učinka genske terapije z molekulami male interferenčne RNA (siRNA) proti endoglinu <i>in vivo</i> . Za označevanje žilja smo se odločili za antigen CD31 ali PECAM, saj se povečano izraža v tumorskih endotelijskih celicah. Testirali smo primarna protitelesa različnih proizvajalcev proti antigenu CD31, od katerih so se je najbolje izkazala protitelesa proizvajalca Abcam. Po optimizaciji protokola in preizkušanju terapije na tumorjih mišjega mamarnega karcinoma TS/A smo opazovali rast tumorja in gostoto žilja. Rast tumorja je bila pri terapevtski skupini v času izvajanja terapije znatno zmanjšana in med samimi skupinami so bile statistično značilne razlike. V primerjavi z ostalimi skupinami je bilo pri terapevtski skupini tudi bistveno manj kapilar. Rezultati kažejo, da bi utišanje izražanja genov za endoglin lahko postal nov način antiangiogenega zdravljenja.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC 6:576.385.5(043.2)=163.6
CX blood vessels/cancer/mice/IHC/siRNA
AU ŠTIMAC, Monika
AA ČEMAŽAR, Maja (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2012
TI OPTIMIZATION AND VALIDATION OF METHOD FOR BLOOD VESSELS STAINING IN MOUSE TUMOR MODELS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 57 p., 2 tab., 27 fig., 0 ann., 94 ref.
LA sl
AL sl/en
AB One of the new approaches to cancer treatment is antiangiogenic therapy, which is aimed at preventing the growth of tumor vessels. Endoglin is a transforming growth factor- β (TGF- β) co-receptor that participates in the activation of a signaling pathway that mediates endothelial cell proliferation and migration in angiogenic tumor vasculature. Endoglin is a candidate for antiangiogenic treatment, because it is found on endothelial cells of tumor vasculature and it is prognostic factor for many tumors (stomach, colorectal, breasts, skin etc.). The aim of our study was to develop and optimize immunohistochemistry (IHC) method for evaluating density of vessels and additionally to evaluate the therapeutic potential of small interfering RNA (siRNA) molecules against endoglin *in vivo*. Vessels were detected by antigen CD31 or PECAM, mainly found on tumor endothelial cells. Primary antibodies of different companies were tested and the antibody of provider Abcam proved to be the most suitable. After protocol optimization and completed therapy in mouse mammary carcinoma TS/A, tumor growth and vessel density were evaluated. Tumor growth was statistically significantly delayed in therapeutic group, when compared to other treatment groups. A same group also had fewer capillaries. Results indicate that silencing of endoglin is a promising antiangiogenic therapy of tumors.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 RAK.....	3
2.2 KARCINOGENEZA	3
2.3 ANGIOGENEZA	6
2.4 VRSTE RAKA	8
2.5 ZDRAVLJENJE	9
2.5.1 Klasične metode zdravljenja raka.....	9
2.5.1.1 Kirurgija.....	9
2.5.1.2 Radioterapija.....	9
2.5.1.3 Kemoterapija.....	9
2.5.2 Novejše metode zdravljenja raka	10
2.5.2.1 Genska terapija	10
2.5.2.2 Žilno ciljano zdravljenje	11
2.6 ENDOGLIN (CD105)	11
2.6.1 Vloga endoglina pri celicah, tkivih in angiogenezi	12
2.6.2 Genetika.....	12
2.6.3 Struktura	12
2.6.4 Signaliziranje.....	12
2.6.5 Endoglin in rak	13
2.7 INTERFERENCA RNA	14
2.8 ELEKTROPORACIJA	16
2.9 METODE IN TESTI ZA RAZISKOVANJE ANGIOGENEZE.....	16

2.9.1	Raziskovanje angiogeneze z metodami <i>in vitro</i>	17
2.9.1.1	Proliferacija endotelijskih celic	17
2.9.1.2	Migracija endotelijskih celic.....	18
2.9.1.3	Diferenciacija endotelijskih celic	19
2.9.2	Raziskovanje angiogeneze z metodami <i>in vivo</i>	20
2.9.2.1	Test na horioalantoidni membrani	20
2.9.2.2	Testi na roženici.....	21
2.9.2.3	Dorzalno okno	21
2.10	HISTOLOGIJA.....	22
2.10.1	Postopek priprave preparata	23
2.10.2	Imunohistokemija (IHC)	24
3	MATERIAL IN METODE	25
3.1	OD ŽIVALI DO TKIVA	25
3.1.1	Živali in tumorji	25
3.1.2	Molekule siRNA	25
3.1.3	<i>In vivo</i> elektrotransfekcija	26
3.1.4	Rast tumorja	26
3.2	OD TKIVA DO PREPARATA	26
3.2.1	Priprava tkivnih rezin – mišje srce, tumorsko tkivo	26
3.3	ANALIZA SLIKE	27
3.4	STATISTIKA	29
4	REZULTATI	30
4.1	PRIPRAVA PROTOKOLA ZA BARVANJE TUMORSKIH KRVNIH ŽIL	30
4.1.1	Primarna protitelesa proizvajalca Abd Serotec	30
4.1.2	Primarna protitelesa proizvajalca BD PharmigenTM	31
4.1.3	Primarna protitelesa proizvajalca Abcam	33
4.2	IHC-PROTOKOL BARVANJA PROTI CD31	35
4.3	UGOTAVLJANJE PROTITUMORSKEGA UČINKA TERAPIJE.....	37
4.3.1	Merjenje rasti tumorja	37
4.3.2	Ovrednotenje učinka elektrotransferja m_siRNA v mišje tumorje z merjenjem gostote tumorskega žilja	38
5	RAZPRAVA	40
6	SKLEP	43

7	POVZETEK	44
7.1	POVZETEK.....	44
7.2	SUMMARY.....	47
8	VIRI	50
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Sl. 1: Različne poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2000: 66).....	5
Sl. 2: Dopolnjen seznam poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2011: 658).....	5
Sl. 3: Stopnje v razvoju tumorja (Čemažar, 2009)	6
Sl. 4: Poti v tumorski angiogenezi (Folkman, 2007: 274)	7
Sl. 5: Signalna pot TGF- β v endotelijskih celicah (Dallas in sod., 2008: 1932).....	13
Sl. 6: Shematski prikaz mehanizma RNAi (Szweykowska - Kulinska in sod., 2003: 219).....	15
Sl. 7: Migracija celic (Staton in sod., 2009: 200)	19
Sl. 8: Dorzalno okno (Staton in sod., 2009: 210)	22
Sl. 9: Krvne žile pobarvane proti CD31 v nezdravljenih tumorjih (Abcam), redčitev 1 : 100.	28
Sl. 10: Binarna slika tumorskih žil kontrolne skupine po obdelavi.	28
Sl. 11: Krvne žile pobarvane proti CD31 v tumorjih zdravljenih z m_siRNA 869 in EP (Abcam), redčitev 1 : 100.....	28
Sl. 12: Binarna slika tumorskih žil terapevtske skupine po obdelavi.	28
Sl. 13: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 50.....	31
Sl. 14: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 100.....	31
Sl. 15: Pozitivna kontrola, tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 50.....	31
Sl. 16: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.	31
Sl. 17: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (BD Pharmigen TM), redčitev 1 : 50.....	32
Sl. 18: Pozitivna kontrola, tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (BD Pharmigen TM), redčitev 1 : 50....	32
Sl. 19: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.	32
Sl. 20: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 100.....	33
Sl. 21: Tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 50, s 40 min namakanjem v ohlajajočem se citratnem pufri.	34
Sl. 22: Tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 50, inkubacija primarnih protiteles 2 uri pri sobni temperaturi.	34
Sl. 23: Pozitivna kontrola, tkivo mišjega srca pobarvano proti CD31 (Abcam), redčeno 1 : 100.	34
Sl. 24: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.	34
Sl. 25: Rast tumorja izpostavljenega 3-kratni terapiji.....	37
Sl. 26: IHC pobarvani preparati TS/A tumorskega tkiva proti CD31 pri različnih terapevtskih skupinah.....	38
Sl. 27: Povprečno število krvnih žil v vidnem polju pri 60-kratni povečavi	39

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Pomen kratic terapevtskih skupin.....	25
Pregl. 2: Seznam primarnih protiteles proti CD31.....	27

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

ALK1	kinaza, podobna aktivinskemu receptorju 1 (ang. activin receptor like-kinase 1)
ALK5	kinaza, podobna aktivinskemu receptorju 5 (ang. activin receptor like-kinase 5)
BALB/C miši	linija imunsko sposobnih, imunokompetentnih miši (ang. inbred miši)
DMSO	dimetil sulfoksid (angl. dimethyl sulphoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
EGFR	epidermalni rastni dejavnik (ang. Epidermal growth factor)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme linked immunosorbant assay)
EP	Elektroporacija (ang. electroporation)
miRNA	mikro ribonukleinska kislina (ang. micro RNA)
MMPs	matriksne metaloproteaze
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (ang. messenger RNA)
MTS	1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid formazan
PBS	izotonični fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)
RISC	z RNA sprožen kompleks utišanja (ang. RNA induced silencing complex)
RNAi	Interferenca RNA (ang. RNA interference)
SCID miši	imunsko oslABLJENE miši (ang. severe combined immunodeficiency)
shRNA	kratka RNA z zanko (ang. short hairpin RNA)
siRNA	mala interferenčna RNA (ang. small interfering RNA)
TGF- β	transformirajoči rastni faktor beta (ang. transforming growth factor beta)
Tumor TS/A	tumor mišjega mamarnega karcinoma
T β R-I,II,III	receptorji tipa I, II in III za TGF- β
VEGF	vaskularni endotelijski rastni faktor (ang. vascular endothelial growth factor)

SLOVARČEK

Angiogeneza	Nastanek novega žilja iz že obstoječega.
Diferenciacija celice	Pri delitvi matičnih celic je ena od nastalih celic hčerinska celica, ki je bolj specifična v svoji funkciji. Končno diferencirana je celica, ki je odgovorna za opravljanje neke naloge v delovanju določenega organa.
Elektroporacija	Metoda, pri kateri se celice oziroma tkiva izpostavi električnemu polju, kar vodi v povečano permeabilnost membran.
Elektrotransfekcija	Način vnosa nukleinskih kislin v celice s pomočjo elektroporacije.
Imunohistokemija	Uporaba interakcije antigena in protitelesa za histokemične tehnike.
Karcinogeneza	Stopnje v razvoju raka, pri katerih ločujemo iniciacijo, promocijo, progresijo in metastaziranje.
Metastaza	Zasevek raka, ki se je iz primarnega mesta razširil v druge dele telesa preko krvi ali limfe.
Migracija celice	Selitev, premik z enega mesta na drugo.
Mutacija	Mutacija je sprememba v zaporedju nukleotidov, lahko je točkasta, kadar je sprememba na enem ali nekaj nukleotidih, ali pa kromosomska, kadar je vključen večji del kromosoma (translokacije, delecije itd.).
Onkogen	Gen, ki je močno izražen v rakavih celicah. Spodbuja hitrejšo delitev in druge značilnosti rakavih celic.
Proliferacija celice	Delitev celice.
Protoonkogen	Normalen gen, iz katerega lahko zaradi mutacije ali povišane ekspresije nastane onkogen.
Rak	Bolezen, pri kateri zaradi mutacij v določenih genih pride do nekontrolirane rasti celic, ki so sposobne invazije v sosednja tkiva in zasevanja.
Tumor	Novotvorba, ki je lahko posledica otekline (vnetja) ali nekontrolirane rasti celic. Tumor je skupno ime za benigne in maligne tumorje (rak).
Tumor-supresorski gen	Gen, ki zaznava poškodbe v celici. Z njegovim utišanjem lahko pride do napačnega delovanja celice in nastanka raka.

1 UVOD

Antiangiogeno terapija je eden od načinov zdravljenja raka, pri katerem ciljamo tumorsko žilje čvrstih tumorjev. Za tumorsko žilje, ki najpogosteje nastane z brstenjem in vraščanjem žil okoli tumorja, je značilna kaotična nehierarhična ureditev, nepopolna dozorelost in večja gostota krvnih žil kot v normalnem tkivu. Terapija temelji na tem, da z zaviranjem oziroma preprečitvijo rasti tumorskih žil delujemo na večje število tumorskih celic, ki potrebujejo žilje za dostop do hranil in kisika za pospešeno rast. Razviti so številni terapevtski pristopi, med katerimi se nekateri že uporabljajo v kliniki. Večina teh pristopov temelji na monoklonskih protitelesih ali majhnih molekulah, inhibitorjih tirozinskih kinaz. V razvoju je tudi antiangiogeni pristop z gensko terapijo, za katero pa je potrebno poiskati nove potencialne tarče. Endoglin (CD105) je vpleten v aktivacijo kompleksne signalne poti TGF- β , ki sproži proliferacijo, migracijo in adhezijo endotelijskih celic. Izražanje endoglina je močno povečano v endotelijskih celicah tumorskih žil in žil, ki obdajajo tumor. Endoglin služi tudi kot prognostični dejavnik številnih tumorjev (želodca, črevesja, kože, dojk, prostate, glave in vratu). Predhodne predklinične raziskave z uporabo monoklonskih protiteles proti CD105 so pokazale, da je CD105 primeren kandidat za antiangiogeno terapijo, a genska terapija z molekulami siRNA (ang. small interfering RNA) proti CD105 v literaturi še ni bila opisana.

Za ugotavljanje protitumorskega učinka antiangiogenih terapij pri čvrstih tumorjih na predkliničnem nivoju je potrebno določiti učinek teh terapij na žilje. Ena od metod za določevanje tega učinka je ugotavljanje gostote tumorskega žilja, ki je možno s pomočjo imunohistokemičnega označevanja endotelijskih celic tumorskih krvnih žil v čvrstih tumorjih laboratorijskih miši. Bistveno pri taki metodi je, da dobimo pozitivno reakcijo na res vseh prisotnih žilah. V literaturi je opisanih več metod za označevanje krvnih žil z različnimi monoklonskimi protitelesi, specifičnimi za prikaz krvnih žil, vendar pa je ključno, da ostanejo med pripravo tkiva antigeni nepoškodovani in «odkriti» ter tako omogočajo vezanje protiteles. Klasična priprava tkivnih parafinskih vzorcev temelji na predhodni fiksaciji tkiva. Izkazalo se je, da klasična fiksacija tumorskega tkiva v formalinu ni primerna za označevanje tumorskega žilja. Fiksacija s formalinom namreč temelji na medsebojnih povezavah proteinov, kar lahko zamaskira prisotne antigene. Drug način je uporaba cinkovega fiksativa, ki je pufer TRIS z dodanimi Zn-ioni, ki manj poškoduje prisotne proteine, zaradi česar ostanejo proteinski antigeni na površini krvnih žil nepoškodovani. V literaturi so podatki o tovrstni fiksaciji za kasnejše dokazovanje krvnih žil zelo redki. Večina opisanih metod v literaturi pa uporablja za dokazovanje krvnih žil zmrzle reze, katerih priprava je tehnično zahtevna. Preparati so v tem primeru nativni, torej niso fiksirani, kar pomeni, da antigeni na površini endotelijskih celic niso poškodovani. Vendar pa je kvaliteta zaledenelih tkivnih rezin slabša in zlasti za kvantitativne študije neprimerna. Za dokazovanje tumorskih žil se pri zmrzlih rezih uporabljajo fluorescentno označena protitelesa. Poleg tega pa je zaradi nativnosti preparatov ostala struktura tumorja

slabo določljiva. Največkrat se za označevanje krvnih žil uporablja protitelesa proti CD31. CD31 ali PECAM je trombocitna endotelijska adhezijska molekula, ki se nahaja v medceličnih povezavah med endotelijskimi celicami, poleg tega pa tudi na nekaterih krvnih celicah. Tumorske endotelijske celice zadržijo izražanje CD31, zato je to zelo primeren antigen za označevanje tumorskih žil.

Delovni hipotezi sta, da z imunohistokemičnim barvanjem krvnih žil s protitelesi proti CD31 dobimo pozitivno reakcijo na vseh tumorskih krvnih žilah ter da genska terapija s siRNA proti CD105 zmanjša gostoto tumorskih krvnih žil pri mišjem mamarnem karcinomu.

Nameni raziskave so testiranje protiteles različnih proizvajalcev proti antigenu CD31 za označevanje krvnih žil v mišjih tumorjih, izdelava protokola imunohistokemičnega barvanja ter ovrednotenje učinka genske terapije proti CD105 siRNA na tumorjih mišjega mamarnega karcinoma z ugotavljanjem gostote tumorskega žilja.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAK

Rak je ime za skupek različnih bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic. Dejavnike, ki vplivajo na nastanek raka, delimo v dve večji skupini; eksogene in endogene. Eksogenim pripisujemo življenjski slog, prehrano ter snovi v okolju s podobno funkcijo kot hormoni, endogenim pa napake pri popravilu poškodb DNA, metabolizmu, hormonih in dedne napake. Faktorji so torej genetski (onkogeni, tumor-supresorski geni, popravljalni geni), endokrini (estrogeni, THS), imunski (imunosupresija), kemični (cigaretni dim, azbest itd.), fizikalni (UV, ionizirajoče sevanje), virusni (hepatitis B, HPV ipd.) ter bakterijski (*Helicobacter pylori*) (Hulka in Moorman, 2008; Jemal in sod., 2011). Bolezen je poznana v celotni človeški zgodovini in narašča s podaljševanjem življenjske dobe. Breme raka v populaciji prikazujemo s pomočjo pojavnosti oziroma incidence. Ta statistični kazalnik izraža število dogodkov, to je novih primerov bolezni, v določeni populaciji v določenem času. Leta 2008 je za rakom v Sloveniji zbolelo 12.180 ljudi, med njimi 6.472 moških in 5.708 žensk. Med najpogostejše rake pri nas spadajo kožni (razen melanoma), rak debelega črevesa in danke, pljuč, prostate in dojke. Pri moških je najpogostejši rak prostate, pri ženskah pa rak dojke. Po napovedih bo od vseh ljudi rojenih leta 2008 do 75. leta starosti predvidoma za rakom zbolel eden od dveh moških in ena od treh žensk (Rak v Sloveniji 2008, 2011).

2.2 KARCINOGENEZA

Karcinogeneza ali razvoj raka je proces, ki ga delimo na iniciacijo, promocijo, progresijo in metastaziranje. Vse tumorske celice so potomke ene same celice, imenovane tumorska matična celica (TMC). Inicijacija je začetna stopnja, na kateri iniciatorji (sevalci, kancerogene snovi, virusi ipd.) neposredno vplivajo na DNA. Mutacije še ne pomenijo nastanka rakave celice, saj so v veliki meri pod vplivom popravljalnih mehanizmov. Uspešna iniciacija kancerogenih sprememb zahteva vsaj dve mutaciji v isti celici. Sledi faza promocije, kjer pride do delitev spremenjenih celic in izražanja pridobljenih lastnosti. Fazo zavirajo razni inhibitorji rasti in hormoni, a če niso uspešni, dobijo osrednjo vlogo faktorji dediferenciacije in angiogeneze. Posledici sta rast in heterogenost tumorja. Ko tumor preseže določeno velikost, se v centralnem delu pojavijo hipoksija, nizek pH ter pomanjkanje hranil, kar spodbudi angiogenezo. Če je tumor ožiljen, se lahko rakave celice odcepijo od gmote in po organizmu tvorijo zasevke, metastaze, kar predstavlja zadnjo stopnjo karcinogeneze. Prične se z intravazacijo (vstopom tumorske celice v žilje), kroženjem po krvožilju, ekstravazaciji (izstopu iz žile), oblikovanju mikrometastaze, kolonizaciji ter formiranju makrometastaze (Novakovič in sod., 2009: 24-35).

Pri maligni transformaciji so potrebne spremembe protoonkogenov ter tumor-supresorskih genov, ki regulirajo popravilo DNA, delitev in celično smrt. Protoonkogeni so prisotni v

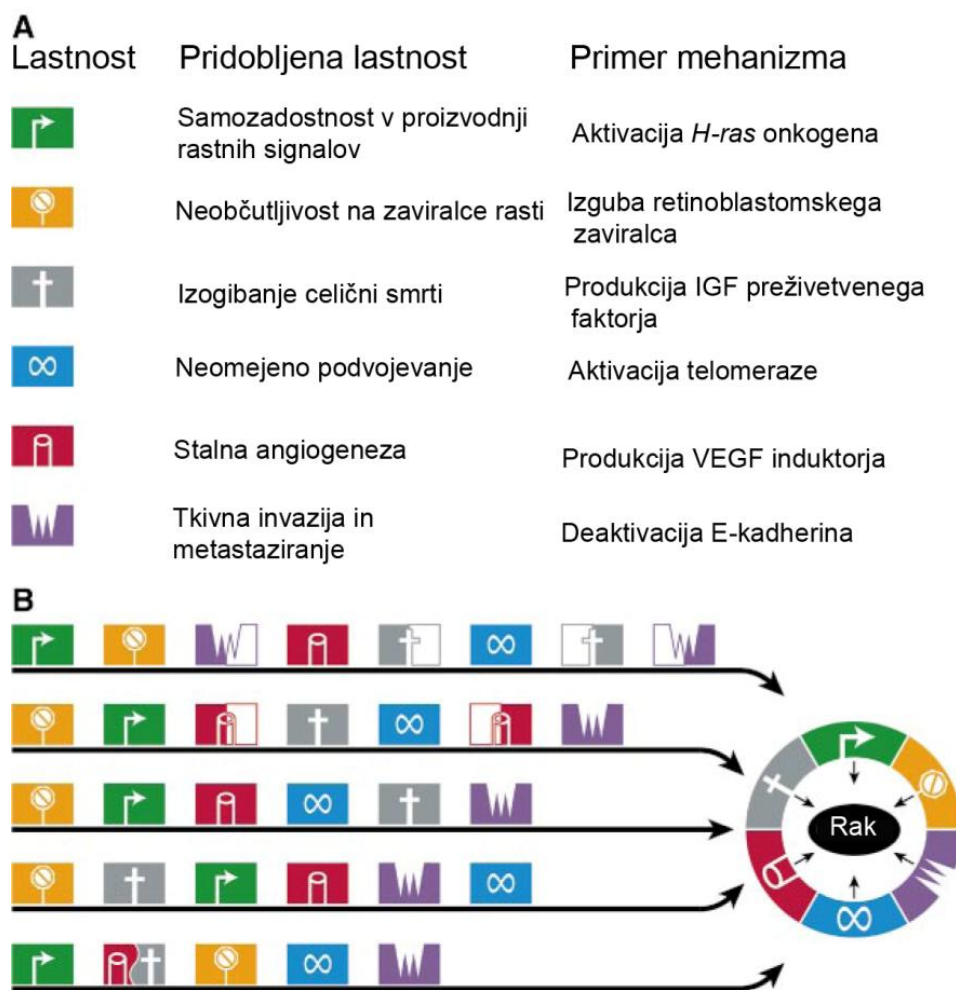
vseh celicah in imajo raznoliko vlogo. Lahko so receptorji, regulatorji rasti, prepisovalni dejavniki, znotrajcelični transkripcijski faktorji ter regulatorji celične smrti. Za pretvorbo protoonkogenov v onkogen, je dovolj že ena mutacija, ki se kaže v nepravilnem signaliziranju, prekomerni celični delitvi, izražanju določenih receptorjev, proteinov ipd.. Za napačno delovanje tumor-supresorskih genov, mora priti do mutacije na obeh alelih. Tumor-supresorski geni so odgovorni za prehajanje celic v različnih fazah celičnega cikla, popravila DNA in aktivacijo celične smrti. Mutaciji alelov vodita v utišanje genov, dediferenciacijo in nenadzorovano rast celic (Vogelstein in Kinzler, 2004). Odkrili so, da so lahko eden izmed dejavnikov nastanka raka mutacije v regijah molekule DNA, ki kodirajo mikro RNA (miRNA, ang. micro RNA). Molekule miRNA so kratke dvoverižne molekule RNA, ki vplivajo na izražanje proteinov na posttranslacijskem nivoju preko razgradnje sporočilne mRNA. K maligni transformaciji celice doprinese mutacija DNA na delu, ki kodira miRNA, ki je vpletena v kontrolo izražanja protoonkogenov ali tumor-supresorskega gena (Tannock in sod., 2005: 123–133, 455).

Leta 2000 sta Hanahan in Weinberg (Hanahan in Weinberg, 2000) predstavila prvi model, kjer trdita, da mora vsaka celica na svoji poti transformacije iz normalne v rakavo celico pridobiti naslednjih šest lastnosti, ne nujno po naštetem vrstnem redu (Sl. 1):

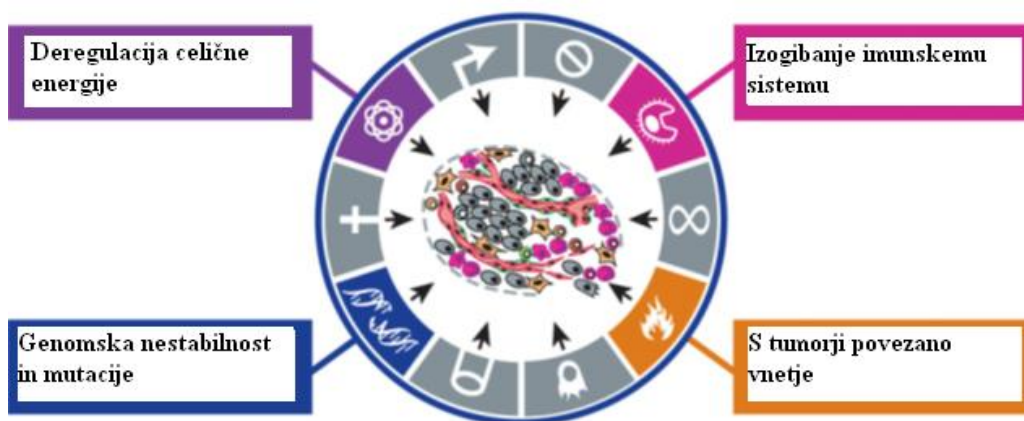
- samozadostnost v proizvodnji rastnih signalov,
- neobčutljivost na zaviralce rasti,
- izogibanje celični smrti,
- pridobitev zmožnosti neomejenega podvojevanja,
- vzpostavitev stalne tvorbe žil, potrebnih za rast tumorja,
- sposobnost invazije v tkiva in metastaziranja (tvorbe zasevkov preko celic, ki se odcepijo od glavnega tumorja in na različne načine potujejo po organizmu).

Leta 2011 sta ista avtorja (Hanahan in Weinberg, 2011) nadgradila seznam z naslednjimi lastnostmi (Sl. 2):

- deregulacija celične energije,
- izogibanje imunskemu sistemu,
- genomska nestabilnost in mutacije,
- s tumorji povezano vnetje.



Slika 1: Različne poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2000: 66)

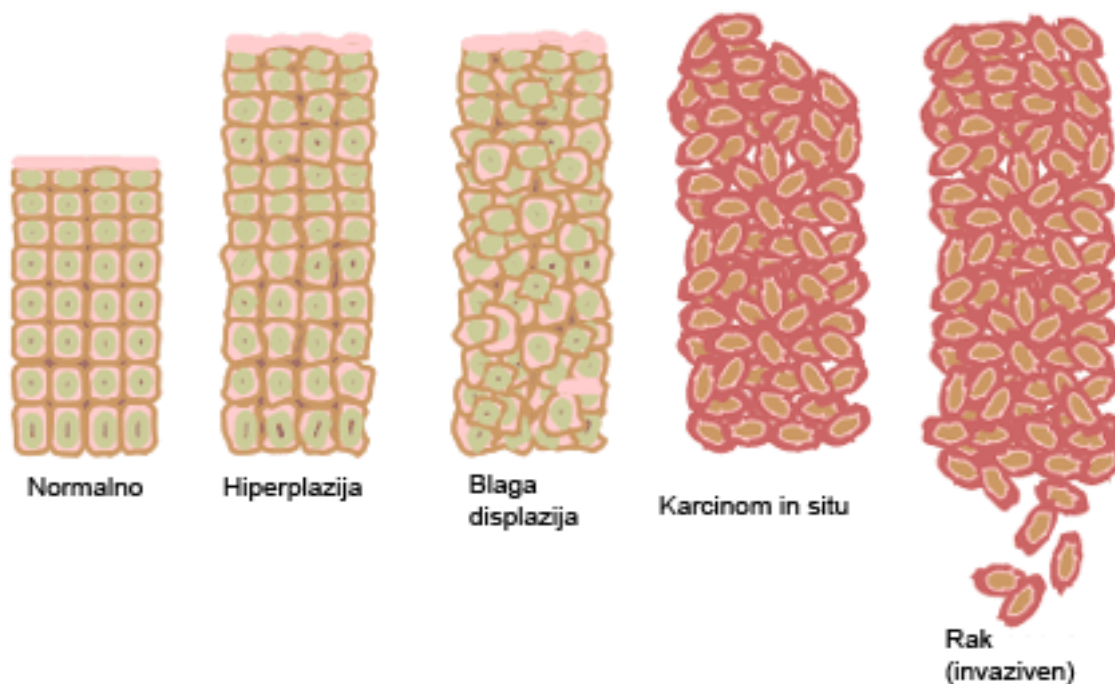


Slika 2: Dopolnjen seznam poti nastanka tumorja (Hanahan in Weinberg, 2011: 658)

Kljub vsemu vse celice ne pridobijo vseh lastnosti in se odražajo kot benigni tumor. Pri malignih tumorjih so vse celice potomke TMC, ki je v svoji evoluciji pridobila nove lastnosti, s tem postala konkurenčnejša od ostalih celic in sočasno tudi bolj dovzeta za nove mutacije. Zaradi tega se v tumorju nahaja heterogena populacija celic (Jordan in sod., 2006).

Z opazovanjem strukture celice in tkiva pod mikroskopom se določa stopnja razvoja raka. Histološka razlika med normalnim in tumorskim tkivom je opazna že zgodaj, vidijo se spremembe v velikosti in obliki celic, celičnega jedra ter v nejasni meji tumorja. Razvoj rakave celice v čvrst tumor sledi štirim značilnim stopnjam, ki so hiperplazija, displazija, karcinom *in situ* ter rak (Sl. 3).

Pri hiperplaziji so celice še normalne, a opazna je spremenjena, nenadzorovana celična delitev. Na tej stopnji je proces še reverzibilen. Če ne pride do popravila, se pojavi displazija. Celice imajo povečano rast in delitev, kar se odraža tudi v neorganiziranosti in spremenjeni strukturi tkiva. Tudi ta faza je reverzibilna, v nasprotnem primeru pa vodi do karcinoma *in situ*. Zanj je značilna dediferenciacija celic, ki pa so še na isti lokaciji. Ob napredovanju se pojavi rak, pri katerem celice vdirajo v okoliško tkivo in tvorijo zasevke (metastaze) po telesu (Čemažar, 2009: 70).



Slika 3: Stopnje v razvoju tumorja (Čemažar, 2009)

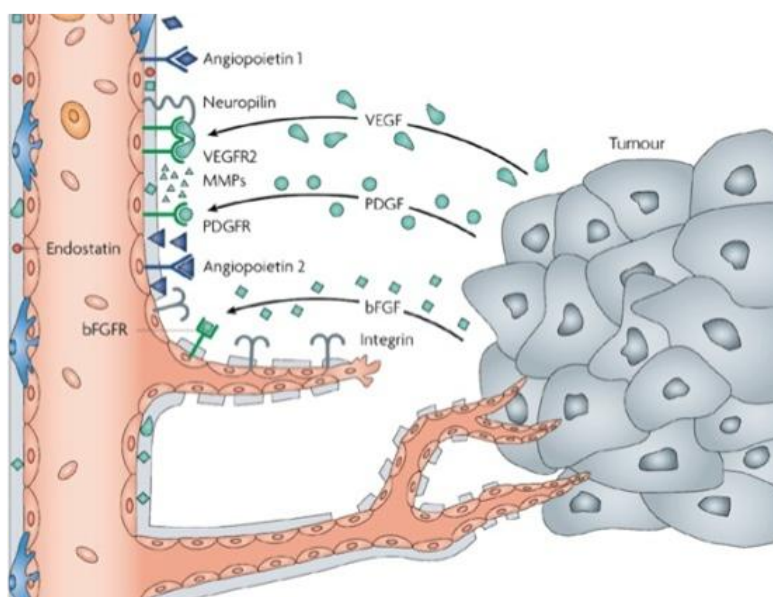
2.3 ANGIOGENEZA

Za rast in razvoj potrebujejo vse sesalske celice nemoten dostop do hranil in kisika. Difuzija je učinkovit način prenosa snovi le na kratke razdalje, npr. za kisik je ta meja med

100–200 μm , zato se je pri večceličnih organizmih razvil krvožilni sistem. Nastanek novih kapilar na različne načine iz že obstoječih žil opredeljujemo kot angiogenezo. Tumor lahko neodvisno zraste do 1–2 mm v premeru in v organizmu miruje tudi več let. To fazo opredeljujemo kot avaskularno, ki pa lahko naenkrat podleže vplivom angiogenih signalov, sproščenih iz tumorskih in gostiteljskih celic v okolico. Razgradi se zunajcelični matriks, endotelijske celice pa migrirajo čez bazalno lamino. Sledi rast tumorja in tumorskega žilja, kar opredeljuje vaskularno fazo (Chung in sod., 2010).

Najpogosteje se pojavlja kot brstenje tumorskih kapilar in zamrežitev že obstoječih žil. Kapilare lahko nastanejo tudi z vstavitvijo medceličnega tkiva lumna, ki se pregradi. Lahko pa v novotvorbo vdrejo angioblasti (prekursorji endotelijskih celic) iz kostnega mozga ali iz krvnega obtoka in tako tvorijo nove kapilare. Angiogeneza je močno odvisna od interakcij med endotelijskimi celicami, ki oblikujejo linijo žile, pericitami, ki so v stiku z endotelijem, stromalnimi celicami (npr. fibroblasti), zunajceličnim matriksom in bazalno membrano žil.

Pri razvoju angiogeneze je odločilno razmerje med njenimi stimulatorji (proangiogenimi faktorji) in inhibitorji. V normalnih razmerah je t.i. »angiogeno stikalo« izklopljeno, saj je razmerje koncentracij v prid inhibitorjem. Angiogeneza se sproži, ko se »stikalo« vklopi zaradi povišane koncentracije stimulatorjev. Prožilci, ki vplivajo na preklon »stikala«, so lahko genetski, imunski, lahko so sproženi tudi zaradi metabolnega (npr. nizek pO_2 , nizek pH, hipoglikemija) in mehanskega stresa (npr. pritisk proliferativnih celic). Signalne molekule, ki tu sodelujejo, so največkrat ligandi in njihovi receptorji na endotelijskih celicah. Med najpomembnejšimi so vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF), angiopietin 1 in 2 (ANG-1 in ANG-2), trombocitni rastni faktor (PDGF) in osnovni fibroblastni rastni faktor (bFGF ali FGF2) (Carmeliet in Jain, 2000).



Slika 4: Poti v tumorski angiogenezi (Folkman, 2007: 274)

Pod vplivom VEGF se iz tumorskih in endotelijskih celic sproščajo metaloproteaze matriksa (MMPs). Te vplivajo na sproščanje proangiogenih faktorjev iz zunajceličnega matriksa in na nastanek antiangiogenih faktorjev (npr. endostatina in angiostatina). Povezavo med endotelijskimi celicami, okoljem in zunajceličnim matriksom omogočajo integrini, ki tako skrbijo za viabilnost celic in njihove odgovore na rastne signale (Sl. 4). Nekteri proangiogeni faktorji lahko preko endotelijskih celic vplivajo na povečano izražanje integrinov. Na ta način se vzdržuje celična viabilnost med odcepitvijo s podlage, ki je potrebna ob migraciji endotelijskih celic žilja k tumorju, saj celice tako postanejo bolj odzivne na rastne signale (Folkman, 2007).

Razlika med tumorskim in normalnim žiljem je očitna. Medtem ko so žile normalnih tkiv lepo organizirane in enakomerno razporejene med celicami, je pri tumorskem ravno obratno. Opazi se neorganizirano razporeditev, mnoge slepe konce, arterio-venozne šante, neenakomerno ožiljenost in slabši pretok krvi. Žilne stene so prepustnejše in tanjše, saj imajo manj gladkega mišičevja. V tumorju se tako pojavijo hipoksični in zakisani predeli. Tip tumorja in vrsta gostiteljskega organa pogojujeta krvno prepustnost ter angiogenezo. Zaradi teh lastnosti se lahko tumorsko žilje hitro opazi in uporabi kot tarčo za razne terapije (Carmeliet in Jain, 2000).

2.4 VRSTE RAKA

Tumorje se v grobem deli na dve skupini; benigne (nerakave) in maligne (rakave). Slednji so za organizem potencialno nevarni, saj rastejo hitro in se širijo v sosednja ali oddaljena tkiva z metastaziranjem. Pri osnovnem razvrščanju se upošteva mesto oziroma organ nastanka raka (npr. rak dojke, pljuč ipd.), s pomočjo histopatologije pa se določi vrsto rakastega tkiva. Tipi raka so poimenovani glede na izvor TMC. V širšem smislu se rak razvršča v štiri kategorije:

- karcinomi – ti zrastejo iz epitelnih celic (celic vrhnjice), ki prekrivajo večino telesnih organov, zato sem spada 80% vseh rakov,
- sarkomi – ti zrastejo iz celic opornih tkiv, zato se nahajajo v vezivu, maščevju, kosteh in hrustancu,
- levkemije so rakaste bolezni krvi in krvotvornih organov, v nasprotju z ostalimi raki se ne pojavijo v obliki zatrdlin ali bul,
- limfomi so rakaste bolezni limfatičnega tkiva, sestavljenega iz mezgovnic in bezgavk.

Poleg zgoraj naštetih skupin bi lahko dodali še dve skupini, in sicer melanom, kjer so mesto izvora melanociti, ter teratom, ki nastane iz spremenjenih zarodnih celic.

Končno ime tumorja je sestavljeno iz vrste celic, od koder se je rak razvil, in mesta nastanka primarnega tumorja (npr. karcinom debelega črevesa) (Čemažar, 2005).

2.5 ZDRAVLJENJE

Vrste zdravljenj so v onkologiji različne. Razvršča se jih glede na vrsto zdravljenja, delovanje, princip uporabe ali po načelih kombinirane terapije.

Glede na delovanje se ločita lokalno in sistemsko zdravljenje. Slednje se je razvilo v sedemdesetih letih kot način kontrole daljnih zasevkov. Lokalno je učinkovito, ko je tumor omejen in dostopen. Zdravljenje se lahko uporablja za več namenov. O kurativnem govorimo, ko želimo tumor odstraniti, paliativno zdravljenje pa je uporabljeno ob preveč napredovali bolezni, pri kateri zdravljenje kot tako ne bi imelo učinka. Rak je kronična bolezen, ki lahko ob navidezni ozdravitvi vnovič vzbrsti, ob čemer povzroča bolečino. Paliativno zdravljenje v tem primeru utiša simptome ter posledice rasti tumorja in je izjemno pomembno, saj je vedno več takih bolnikov, ki se jim na ta način lahko podaljša življenje. Kombinirana terapija je uporabna predvsem pri napredovali, sistemski bolezni. Kombinira se delovanje zdravljenja; lokalno-lokalno (če je primarni tumor velik), sistemsko-lokalno (če primarni tumor metastazira).

Glede na vrsto zdravljenja se loči klasične in novejšie metode.

2.5.1 Klasične metode zdravljenja raka

2.5.1.1 Kirurgija

Je ena izmed najstarejših, a vendarle zelo uporabnih metod. Učinkovita je pri čvrstih in dostopnih tumorjih, kjer se odstrani celotna tumorska masa. Če so prisotne metastaze, pa se ta metoda kombinira z obsevanjem ali kemoterapijo.

2.5.1.2 Radioterapija

Druga najpogostejša in najuspešnejša metoda je radioterapija. Predstavlja lokalni način zdravljenja z ionizirajočim sevanjem (rentgenski, gama žarki in elektroni). Sevanje povzroči poškodbe bioloških makromolekul, glavna tarča je DNA, kar lahko vpliva na delovanje celice. Učinki delovanja na DNA so lahko neposredni ali posredni zaradi delovanja prostih radikalov. Cilj je ubiti tumorske celice, ob čemer mora okoliško tkivo ostati nepoškodovano. Zaradi tega je obsevanje aplicirano le na vnaprej določen volumen tkiva. Uporablja se pri 60% zdravljenj, predvsem takšnih, ko tumor ni dostopen ali pa so prisotne metastaze. V slednjem primeru se zdravljenje kombinira s kirurgijo ali kemoterapijo (Novakovič in sod., 2009: 120–155).

2.5.1.3 Kemoterapija

Je standardni, sistemski način zdravljenja. Uporablja se naravne ali sintetične produkte, ki imajo citotoksičen učinek. Ti v celici vplivajo na sintezo makromolekul (DNA, RNA in proteinov) ali pa na njihovo delovanje. Klasični kemoterapevtiki so alkilizirajoča zdravila, inhibitorji topoizomeraz, antimetaboliti (preprečijo sintezo ključnih metabolitov) ter rastlinski alkaloidi (inhibitorji delitvenega vretena). Kemoterapija učinkuje na vse celice v

organizmu, a ima večji vpliv na rakave celice zaradi hitrejših celičnih delitev. Dobra stran te metode je v tem, da deluje tudi na mikrometastaze, ki se jih pri pacientu ne odkrije hitro. Pogosti so stranski učinki, kot so toksičnost, izpadanje las, luščenje kože, neredna prebava ipd. (Tannock in sod., 2005: 349–375).

2.5.2 Novejše metode zdravljenja raka

Želja po čim bolj tarčnem zdravljenju je pripeljala do razvoja novih metod, ki pri zdravljenju raka specifično vplivajo na molekule, ki nastajajo le v rakastih celicah ali pa so pri teh spremenjene. Med t. i. tarčna zdravila spadajo biološka zdravila, ki so monoklonska protitelesa in majhne molekule, vpletene v spremenjene znotrajcelične tirozin-kinazne poti. K novejšim metodam zdravljenja prištevamo tudi gensko terapijo, imunoterapijo (imunomodulatorji, imunokonjugati, imunotoksini, tumorska cepiva, nekonjugirana protitelesa) in kombinacije različnih metod. Raznolik je tudi način dostavljanja takih zdravil do mesta delovanja, saj se uporablja nanodelce, elektroporacijo, ultrazvok in magnetno dostavljanje (Vanneman in Dranoff, 2012).

2.5.2.1 Genska terapija

Genska terapija vključuje različne vnosne sisteme (s plazmidi, liposomi, virusi ipd.), s katerimi vnaša terapevtski gen v tarčno tkivo. Tam se mora prepisovati, ustvariti produkt in delovati. Med strategije genske terapije raka spada kompenzacija mutacije, genska imunopotenciacija in molekularna kemoterapija. Mutacijo se kompenzira z utišanjem ekspresije dominantnega onkogenega ali z indukcijo izražanja tumor-supresorskega gena. Genska imunopotenciacija, ki je danes najuspešnejša, zajema citokine in kostimulatorne molekule, medtem ko se pri molekularni kemoterapiji osredotoči na produkcijo encimov s citotoksičnimi učinki (Vanneman in Dranoff, 2012; Liu in Kirn, 2008)

Danes je mnogo terapevtskih genov, ki so prešli v klinične raziskave. Med temi so (Kesmodel in Spitz, 2003; Palmer in sod., 2006):

- tumor-supresorski gen *p53*,
- protismiselni (ang. anti-sense) oligonukleotidi in molekule siRNA, ki s specifično vezavo na tarčno mRNA onkogenega inhibirajo njegovo izražanje (npr. *Her-2/neu*, *cyclin-E*, *c-myc*),
- geni za interleukine (*IL-2*, *IL-4*, *IL-12*), *HLA-B7* in *MHC*, ki spodbudijo gensko imunopotenciacijo,
- gen za timidin kinazo virusa *Herpes simplex*, ki aktivira sistemsko vnesen ganciklovir (GCV) v tarčnih celicah (aktiven GCV vpliva na inhibicijo sinteze DNA v delečih se celicah),
- onkolitični adenovirus ONYX-015 in virus *Herpes simplex* G207, ki z delitvami povzročita lizo le tumorskih celic ali nastanek toksičnih produktov, ali pa spodbudita imunski odziv proti tumorskim celicam.

2.5.2.2 Žilno ciljano zdravljenje

Prednost terapevtskega ciljanja tumorskega žilja je posledica genetske nestabilnosti endotelijskih tumorskih celic. Uporabni sta dve terapiji; žilno razdiralna ter antiangiogena.

Žilno razdiralna terapija deluje na obstoječe žile. Delovanje je akutno, žile se poškodujejo in pretok krvi v obstoječih tumorskih žilah je prekinjen. To povzroči ishemijo, ki spodbudi kaskado umiranja tumorskih celic ter hemoragično nekrozo, ki se kaže kot zaostanek v rasti tumorja. Glede na to, da ta metoda razdira obstoječe žile, se jo uporablja kot občasno terapijo. Poznanih je več terapevtikov, a med pomembnejšimi so ti, ki se specifično vežejo na tubulinske komponente endotelijskega citoskeleta (npr. kombretastatini, analogi flavonske očetne kisline ipd.) (Serša in sod., 2008).

Antiangiogena terapija se uporablja za preprečevanje nastanka novih žil, kar je uspešno tudi pri mikrometastazah. Je stalna, kronična terapija, ki inhibira delitve endotelijskih celic in sproščanje proangiogenih faktorjev ter posredno vpliva na zaostanek v rasti tumorja. Uporablja se monoklonska protitelesa za vezavo na endotelijske faktorje ali njihove receptorje, medtem ko so male molekule pomembne za inhibicijo znotrajcelične tirozin-kinazne poti. Ta terapija je dodatek h klasičnemu zdravljenju nekaterih vrst rakov (Serša in sod., 2008). Veliko inhibitorjev angiogeneze je že v zadnjih fazah kliničnih poiskov (npr. Marimastat, Neovastat ipd.). Do sedaj je ameriška agencija za prehrano in zdravila (FDA - US Food and Drug Administration) odobrila uporabo VEGF nevtralizacijskega protitelesa, bevacizumaba (Avastin), za metastazirajoče rake, kot so rak dojke, kolorektalni, karcinom renalnih celic (RCC), multiformni glioblastom ter »nedrobno celični« (refraktorni) pljučni rak. Razviti so tudi blokatorji signalnih poti, kot je signalna pot VEGF. V kliniki se od teh uporablja sorafenib (Nexavar) za metastatski RCC in hepatocelični karcinom. Za RCC se uporabljata sunitinb (Sutent) in pazopanib (Votrient). Med zadnje odobrene spada vandetanib (Zactima), ki se ga lahko uporablja za zdravljenje metastatskega medularnega ščitničnega raka (Carmeliet in Jain, 2011).

Antiangiogena terapija ima dobre in slabe strani. V prid terapiji je preprost dostop do tumorskih celic preko krvnega obtoka. Lahko se jo uporablja pri različnih vrstah čvrstih tumorjev, saj ti potrebujejo žile za nadaljnjo rast, zato uničenje teh pomeni smrt mnogih tumorskih celic. Slaba stran terapije so možne interakcije s fiziološkim angiogenim procesom (npr. celjenje ran ali bolezni) ter preživelost nekaterih tumorskih celic po terapiji. (Nassiri in sod., 2011).

2.6 ENDOGLIN (CD105)

Endoglin je transmembranski glikoprotein, izražen pri aktiviranih vaskularnih endotelijskih celicah. Je pomožni protein transformirajočega rastnega faktorja β (TGF- β), čigar ligandi in receptorji gradijo kompleksen signalni sistem, vpleten v različne razvojne, fiziološke in patološke procese (Dallas in sod., 2008).

2.6.1 Vloga endoglina pri celicah, tkivih in angiogenezi

Stopnja izražanja endoglina je v normalnih razmerah zelo nizka. Med izomerama prevladuje L-endoglin, ki se v večini nahaja na endotelijskih celicah, medtem ko najdemo S-endoglin v jetrih in pljučih. Moč ga je zaslediti na celicah retikuloendotelijskega sistema, kot so monociti in makrofagi, v krvotvornih celicah kostnega mozga, v celicah gladkih mišic žilnih sten, melanocitih, v celicah urogenitalnega sistema ter pri zarodku (ten Dijke in sod., 2008). Angiogeneza med razvojem zarodka, celjenje ran, vnetje, hipoksija, določeni ligandi (TGF- β , kostni morfogenetski protein (BMP)) in tumorji lahko povečajo njegovo lokalno izražanje. Specifičen je predvsem pri raku prostate, jajčnikov in melanomu. Hemoragična teleangiektazija kaže nujnost endoglina za normalno tvorbo žil. To je avtosomna dominantna dedna bolezen, pri katerih pride do mutacije gena za endoglin. Pri bolnikih so opazne pogoste in življenjsko nevarne krvavitve. Poskusi na mišjih zarodkih, z manjkajočim genom za endoglin so pokazali, da pride do nepravilne tvorbe žil v rumenjaku vrečki. Žile se razvijajo in širijo, a so krhke, zato zarodki odmrejo v desetih dneh (Dallas in sod., 2008).

2.6.2 Genetika

Gen za endoglin, ki je dolg 40 000 baznih parov, se nahaja na človeškem kromosomu 9q34. Po prepisu nastane 3400 nukleotidov dolga mRNA, ki vsebuje 14 eksonov. Prva dvanajsterica zapisuje zunajcelično domeno, trinajsti ekson dolgo transmembransko, štirinajsti pa znotrajcelično domeno (Dallas in sod., 2008).

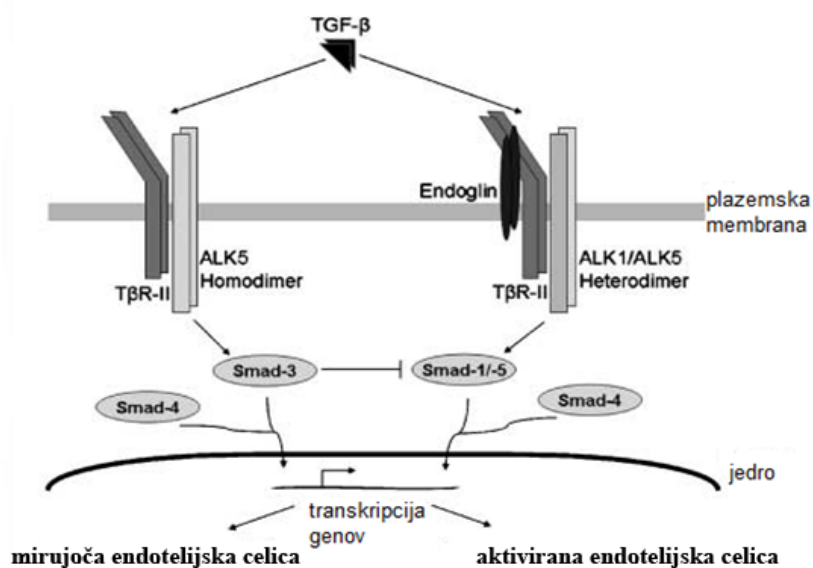
2.6.3 Struktura

Dve monomerni podenoti, povezani z disulfidnimi vezmi, sestavljata homodimer endoglin, velik 180 kDa. Vsako podenoto sestavljajo tri domene; dolga zunajcelična ter kratki transmembranska in znotrajcelična. Povezavo z integrini in zunajceličnim matriksom omogoča tripeptid RGD (Arg-Gly-Asp). Ta je pomemben del zunajcelične domene, ki sestavlja še zono pelucido in siroto. Medtem, ko domena sirota ni strukturno podobna nobenim poznanim domenam, predstavlja 260 aminokislinskih ostankov dolga zona pelucida vezavno mesto endoglina in ostalih proteinov v receptorskem kompleksu TGF- β (ang. transforming growth factor β). Celično membrano prečka transmembranska domena le enkrat. Endoglin je lahko izražen v dveh izoformah; dolgi L-endoglin (L-CD105) s 658 aminokislinskimi ostanki in s 625 aminokislinskimi ostanki kratki S-endoglin (S-CD105) (ten Dijke in sod., 2008). Izoobliki se razlikujeta ne le po dolžini znotrajcelične domene, ampak tudi v sami aminokislinski sestavi, stopnji fosforilacije in izražanju v tkivih. Zanimivo je, da tripeptida RGD pri glodalskem endoglinu ni (Nassiri in sod., 2011).

2.6.4 Signaliziranje

Receptorje signalnega sistema TGF- β , kamor spada tudi endoglin, se deli v tri razrede; receptorjev tipa I (T β R-I) je sedem, tipa dva (T β R-II) pet, dva pa sodita med receptorje tipa tri (T β R-III). Pri celičnem odgovoru na TGF- β , sodeluje kinazna domena

serin/treoninskih-kinaznih receptorjev, kamor sodita T β R-I in T β R-II. Endoglin in betaglikan, receptorja tipa tri, ki nimata kinazne domene, regulirata vezavo in signaliziranje. Signaliziranje TGF- β v endotelijskih celicah vpliva stimulatorno ali inhibitorno na različne celične procese, kot so proliferacija, migracija in adhezija. Signalna pot se prične s celičnim izločanjem TGF- β v neaktivni obliki. Aktivirajo ga različne proteaze ali trombospondin in tako omogočijo njegovo vezavo na homodimerni T β R-II. Ta se z T β R-I in ALK1 (ali ALK5) poveže v heterotetramerni receptorski kompleks. Signaliziranje preko ALK1, ki je običajno aktivno med angiogenezo, potrebuje v receptorskem kompleksu endoglin, da pride do aktivacije transkripcije proangiogenih genov, odgovornih za migracijo in proliferacijo endotelijskih celic. Signaliziranje z ALK5, ki prevladuje v normalnih endotelijskih celicah, se kaže kot stanje mirovanja z inhibicijo proliferacije in migracije ter sočasnim izražanjem zrelostno-specifičnih genov. Da pride do prenosa signala v celico, se mora receptor konformacijsko spremeniti. To omogoči T β R-II s fosforilacijo serinskih in glicinskih citoplazemskih domen ALK1 ali ALK5 (Sl. 5). V jedru delujejo fosforilirani proteini Smad kot transkripcijski koaktivatorji ali korepresorji (Dallas in sod., 2008).



Slika 5: Signalna pot TGF- β v endotelijskih celicah (Dallas in sod., 2008: 1932)

2.6.5 Endoglin in rak

Povišana ekspresija endoglina je zaznana pri aktivnih in proliferacijskih tumorskih endotelijskih celicah (Nassiri in sod., 2011). To so opazili pri raku pljuč, možganov, dojke, prostate, debelega črevesja ter materničnega vratu (Duff in sod., 2003). Pri ljudeh, ki so imeli rak dojke ali prostate, so zaznali povišano količino topnega endoglina tudi v urinu. (Fujita in sod., 2009; Li in sod., 2000).

Z uporabo označenih anti-endoglinških monoklonskih protiteles se lahko izboljša način detekcije tumorjev. Costello in sod. (2004) so vzeli pacientovo ledvico s karcinomom in naredili *ex vivo* analizo. Analiza z magnetno resonanco (MRI) pred operacijo je pri večini pacientov pokazala mesta tumorjev, prav tam, kjer so jih odkrili z radiografijo. Pri slednji so uporabili z radioaktivnim tricijem (^{99}Tm) označena anti-endoglinška monoklonska protitelesa in z njimi odkrili maligno tumorsko maso, ki je pred operacijo z MRI niso opazili. Radioaktivno označena anti-endoglinška monoklonska protitelesa so uspešno uporabili za slikanje človeških melanomskih ksenograftov v miših ter induciranih adenokarcinomov na psih (Nassiri in sod., 2011).

Uporaba endoglina kot tarče za terapijo proti raku se je začela z *in vitro* poskusi na humanih umbilikalnih venskih endotelijskih celicah (HUVEC), kjer so anti-endoglinška monoklonska protitelesa inducirala apoptozo (Düwel in sod., 2007). Temu je sledil razvoj omenjenih protiteles, ki delujejo preko citotoksičnih T-celic, ter njihovo testiranje *in vitro* (Korn in sod., 2004). Aplikacijo teh protiteles so testirali še z dostavnimi sistemi; z nanodelci in imunoliposomi, ki imajo na površini vezano variabilno regijo protitelesa proti endoglinu (fragment Fv). Študije na imunsko oslabljenih SCID (ang. severe combined immunodeficiency) miših *in vivo* so pokazale, da je na tak način prišlo do inhibicije tumorske rasti in metastaziranja. To je bila posledica uničenja tumorske vaskulature in/ali inhibicije tumorske angiogeneze. Izgleda, da je učinkovitost terapije odvisna od lokacije tumorja in prisotnosti T-celične imunosti (Nassiri in sod., 2011). Anti-endoglinška monoklonska protitelesa se lahko konjugirajo tudi z različnimi toksičnimi snovmi, kot sta sevalec Augerjevih elektronov in deglikoziliran ricin A. Na ta način se poveča njihov terapevtski potencial, saj tumorji zaostanejo v rasti in stranskih učinkov ob tem ni (Matsuno in sod., 1999; Tabata in sod., 1999).

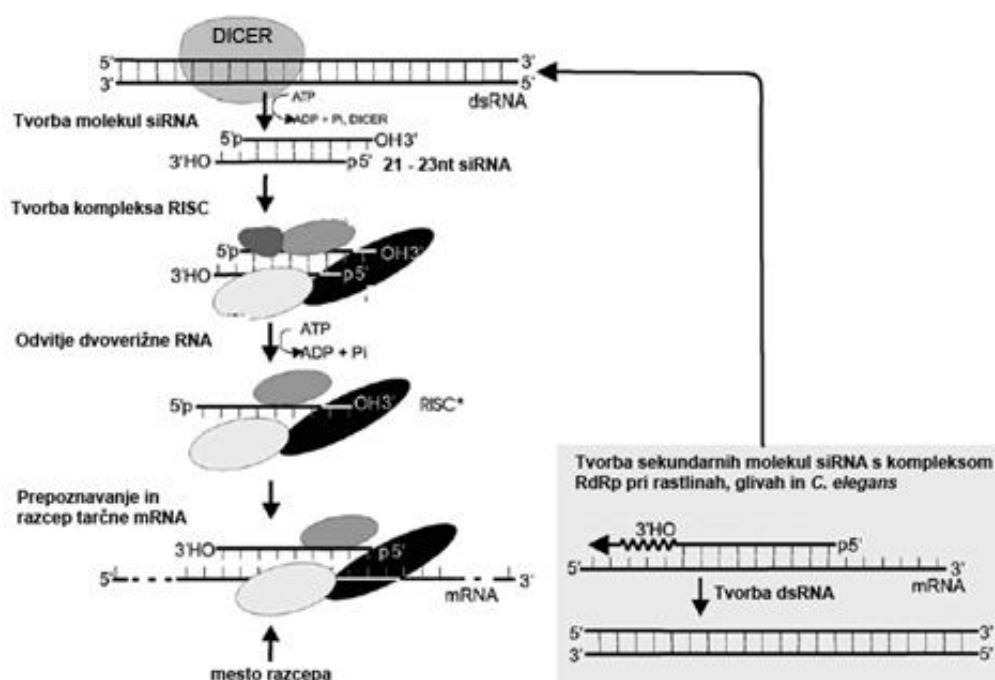
Za ljudi z napredovanim neodzivnim rakom se razvija novo anti-endoglinško monoklonsko protitelo, ki je še v fazi I kliničnih raziskav. Vežalo se bo na tumorske receptorske celice endoglina, katera doza bo učinkovita, pa se še raziskuje (Nassiri in sod., 2011).

2.7 INTERFERENCA RNA

Interferenca RNA je evolucijsko star obrambni mehanizem, ki ščiti organizem pred eksogenimi in endogenimi nukleinskimi kislinami ter posttranskripcijsko uravnava izražanje genov. K interferenčnim RNA molekulam spadajo siRNA, miRNA ter shRNA (ang. small hairpin RNA) (Hannon, 2002).

Interferenco RNA (RNAi) so pri živalih najprej odkrili pri glisti *Caenorhabditis elegans*, kot odgovor na dvoverižno RNA (dsRNA), katere posledica je bila utišanje specifičnih genov. Encim Dicer, ki spada med RNA-endonukleaze tipa III, prepozna dsRNA v citoplazmi celice in jo razreže na krajše fragmente (21-23 nukleotidov). Nastanejo siRNA, ki se nato povežejo s katalitskim proteinom Argonaute 2 (Ago 2), ki je del encimskega kompleksa RISC (ang. RNA-induced silencing complex). To privede do razcepa dsRNA

tako, da se odstrani smiselna veriga, protismiselna pa ostane vezana na kompleks. Slednja omogoči prepoznavanje in vezavo homologne tarčne mRNA na kompleks RISC. Taka mRNA se nato razcepi, kar pomeni preprečitev translacije in biosinteze napačnih proteinov, njene ostanke pa odstranijo razne celične nukleaze. Nadalje kompleks RISC-RNA razpade na proteinske podenote, ki se reciklirajo za naslednji cikel, in protismiselno RNA. Ta se s pomočjo encima RdRP (ang. RNA dependent RNA polymerase) podaljšuje na podlagi tarčne mRNA. Nastanejo dolge dsRNA, ki jih prepozna in razreže encim Dicer (Sl. 6). S ponavljanjem cikla tako nastane veliko siRNA, ki se širijo tudi v sosednje celice. To privede do dolgotrajnega utišanja specifičnega gena v večini celic organizma (Aronin, 2006).



Slika 6: Shematski prikaz mehanizma RNAi (Szweykowska - Kulinska in sod., 2003: 219)

Tehnologija RNAi se danes uporablja v znanosti in poskusnem zdravljenju različnih bolezni. Med te sodijo razne virusne okužbe, nevrodegenerativne bolezni, očesne bolezni ter rak. Pri raku tarčne gene ločimo v tri skupine; v prvo sodijo geni sodelujoči pri karcinogenezi, v drugo geni udeleženi v interakcije med okoljem in celico ter v tretjo geni odgovorni za odpornost rakavih celic proti kemoterapiji in radioterapiji (Pai in sod., 2006).

Vnos siRNA v celice lahko poteka preko virusnih (retrovirusi, lentivirusi, adenovirusi ipd.) ali nevirusnih vektorjev. Slednje delimo na lipidne vektorje, ki so lahko kationski ali nevtralni ter na polimerne vektorje. Pri polifekciji se uporablja različne polimerne snovi (npr. polietilenamine), ki tvorijo različne vektorje, kot so nanokapsule, nanosfere in dendrimeri. Pri fizikalnem načinu vnosa prevladujejo elektroporacija, biolistika ter hidrodinamski pristop (Ramon in sod., 2008).

Učinkovitost terapije ni odvisna le od načina vnosa, ampak tudi od časa razgradnje vnesene RNAi. Utišanje genov z vnosom siRNA je lahko zelo uspešno, tudi okrog 90-odstotno, a je lahko hkrati kratkotrajno zaradi razgradnje v celicah (Whitehead in sod., 2009).

2.8 ELEKTROPORACIJA

Celice so obdane z membrano iz lipidnega dvosloja, ki uravnava izmenjavo snovi z okoljem. Celična membrana je polprepustna, saj omogoča pasiven prehod majhnim in nepolarnim molekulam, medtem ko večje in nabite molekule aktivno uporabljajo različne črpalke, izmenjevalce in nosilce. Lahko se zgodi, da je določena molekula, med katerimi so mnoge terapevtske, prevelika za ta način vnosa in zato ne prehaja v celico. Prehajanje takih molekul v celico je mogoče s spremembo propustnosti celične membrane, kar omogoči elektroporacija. Elektroporacija oziroma elektropermeabilizacija je metoda, pri kateri se celice ali tkiva izpostavi električnemu polju s povečano jakostjo (Neumann in sod., 1982; Neumann in Rosenheck, 1972). Učinkovitost vnosa molekule v celico je pogojena z velikostjo same molekule ter načina elektroporacije. Na slednjo vplivajo parametri električnih pulzov ter lastnosti celice in zunajceličnega okolja (Bernhardt in Pauly, 1973; Teissie in sod., 2008; Čemažar, 2005). Intenzivnost elektroporacije se uravnava z električnimi pulzi privedenimi pravokotno na podlago, ustrezno amplitudo, trajanjem, številom in ponovitveno frekvenco pulzov. Ko jakost električnega polja preseže kritično vrednost (med 0,2 in 1 V), se povečata prepustnost in prevodnost celične membrane. Večje število celic se elektroporira naenkrat, ko želimo vanje vnesti različne molekule. Na ta način se lahko doseže reverzibilna elektroporacija, ki ohranja viabilnost celic. Če je električno polje previsoko, lahko pride do ireverzibilne elektroporacije in celične smrti zaradi trajno destabilizirane membrane (Kotnik in sod., 2005).

Čeprav je bila elektroporacija (EP) primarno razvita za vnos genov (Čemažar in sod., 2002), se danes uporablja za dostavo širokega spektra molekul, kot so zdravila, barvila, protitelesa, oligonukleotidi, RNA in DNA (Gehl, 2003; Čemažar, 2005; Čemažar in sod., 2006; Čemažar in Serša, 2007).

2.9 METODE IN TESTI ZA RAZISKOVANJE ANGIOGENEZE

Kljub intenzivnim raziskavam angiogeneze v zadnjih desetletjih, pa nekateri segmenti omenjenega procesa ostajajo neznanka. Težavi pri raziskovanju sta identifikacija potencialnih tarč v samem procesu ter izbira primerne načina ocene uspešnosti nove terapije ali zdravila. V vrednotenju rezultatov tako lahko pride do nasprotij, ki pa bi se rešile le ob iznajdbi idealnega orodja. To bi moralo biti robustno, zanesljivo, hitro, računalniško vodeno, z upoštevanjem več parametrov, s pozitivno in negativno kontrolo ter v končni fazi v neposredni povezavi s kliniko. Kljub številnim metodam *in vivo* ter *in vitro* za raziskovanje angiogeneze, zlatega standarda še ni, zato se običajno kombinira več metod hkrati.

2.9.1 Raziskovanje angiogeneze z metodami *in vitro*

Večina *in vitro* metod se osredotoča na endotelijske celice ter njihovo migracijo, proliferacijo in diferenciacijo, ki so ključne za angiogenezo. Omenjene metode pa ob tem zanemarjajo raznolikost celičnih tipov, praviloma pa ne vključujejo okoliškega tkiva, krvožilja, bazalne membrane in zunajceličnega matriksa..

2.9.1.1 Proliferacija endotelijskih celic

Celična proliferacija predstavlja delitev celic. Proliferacijski testi so zelo uporabni, saj so preprosti za izvajanje in privedejo do natančnih kvantitativnih podatkov. Na začetku preizkusa se mora zagotoviti ustrezna gostota celic v kulturi, da ne pride do kontaktne inhibicije, pomanjkanja hranil ter kopičenja odpadnih produktov. Določiti je potrebno stanje mirovanja, kjer se lahko zazna proangiogene dejavnike. Analiza celic poteče takoj po izolaciji, saj se celice zaradi delitev starajo. Po nasaditvi celic se opazuje proliferacijo, kjer se upošteva, da je število delečih se celic proporcionalno neto številu celic (Staton in sod., 2009).

Najpreprostejši način za ocenitev proliferacije je določevanje skupnega števila celic. Uporabi se lahko hemocitomer (za štetje pod svetlobnim mikroskopom), elektronski števec delcev (»coulter counter«) ter števec viabilnih celic (»Vi-cell counter«) (Staton in sod., 2009).

Zelo uporabne so kolorimetrične metode, pri katerem se spremlja število metabolno aktivnih celic v preučevani populaciji. Najpogosteje se kot substrat uporablja vodotopna rumena tetrazolijeva sol MTT (3-(4,5,-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid). V živih celicah se MTT pod vplivom mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze cepi in nastajajo nevodotopni modro-vijolični kristali formazana. Formazan se kopiči le v živih celicah, raztopi pa se z dodatkom organskih topil, kot sta DMSO (dimetil sulfoksid (angl. dimethyl sulphoxide)) in izopropanol. Raztopljen produkt kvantificiramo z merjenjem absorbance s pomočjo spektrofotometra. Test MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) temelji na enakem principu kot MTT, le da se tvori topni formazan (Wemme in sod., 1992).

Opazovanje sinteze DNA in njeno merjenje je učinkovita metoda, ki jo lahko izvajamo na več načinov. En način je ta, da se vrednoti radioaktivnost novonastale DNA, ki se ji je vgradil (3H)timidin. Stopnja radioaktivnosti je sorazmerna novonastali DNA (Yu et al. 2004). V zadnjem času se radioaktivni timidin zamenjuje z bromodeoksiuridinom (BrdU), ki se v DNA vgradi med S-fazo celičnega cikla. Stanje posamezne celice se lahko ovrednoti s pomočjo imunocitokemije (ICC), če pa je bistvena populacija celic, se uporabi metoda ELISA. Pri njej se večkrat pojavi vprašanje, če so res vse DNA novonastale ali je katera bila tedaj le popravljena. Zaradi tega se je uveljavilo merjenje ekspresije PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen) v celicah. Ekspresija PCNA narašča med fazo G1, vrh doseže v fazi S, med fazama G2/M pa upada. Na ta način se ločuje proliferativne celice

od mirujočih. Za lažjo kvantitativno in vizualno detekcijo je možna nadgradnja z ICC (Neckers in sod., 1995)

Neposredna analiza faze celičnega cikla je možna s pretočno citometrijo. Kot označevalec celične DNA se uporabi BrdU, ki mu sledi saturacijsko barvanje s propidijevim jodidom (PI). PI se uporabi za določanje celotne količine DNA v celici, sama meritve se opravi s pretočnim citometrom. Dobljeni rezultati prikažejo distribucijo faz celičnega cikla, stopnjo proliferacije in apoptoze v celični populaciji. V kratkem času lahko na omenjen način obdelamo veliko število celic. Slaba stran te metode je možna celična avtofluorescenca in velika količina uporabljenega materiala (Gomez in Reich, 2003)

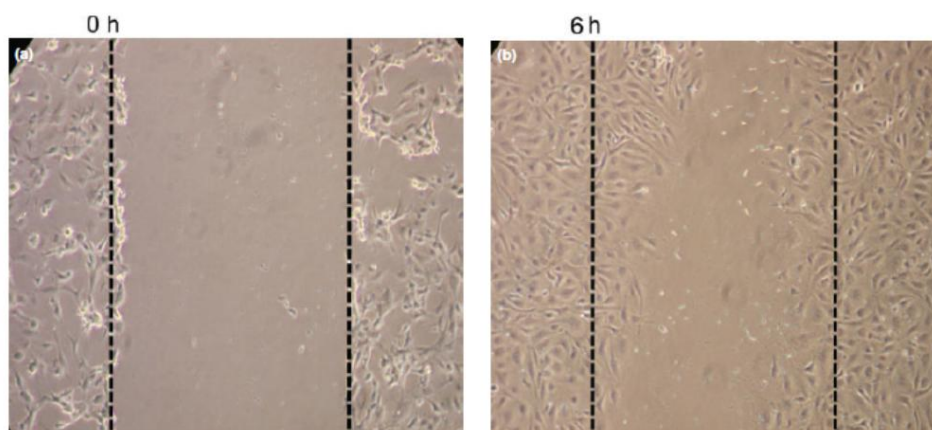
Za pravilnejše določanje stopnje proliferacije je tako priporočljivo kombinirati več metod; npr. test MTT in merjenje sinteze DNA (Staton in sod., 2009).

2.9.1.2 Migracija endotelijskih celic

Med angiogenezo endotelijske celice signalizirajo razgraditev bazalne membrane in migracijo v perivaskularno stromo. Za kvantitativno vrednotenje migracije se uporablja različne tridimenzionalne modifikacije Boydenove komore in metode migracije skozi filtre (Boyden, 1962). Celice se nasadi na filter z 8 μm premerom por. Filter je pokrit s proteini izvenceličnega matriksa, kot sta kolagen in fibronektin, ali pa je bolj kompleksen (npr. Matigel). V spodnji komori so koncentrirani proangiogeni faktorji, ki privlačijo migrirajoče celice (Albini in sod., 2004). Metoda je občutljiva že na majhne spremembe v koncentraciji angiogenih faktorjev, dobra stran je tudi njena hitrost, saj je test opravljen v 4–6 urah (Taraboletti in sod., 1990).

Za ocenitev migracije je v uporabi več metod. Med klasičnimi je navadno štetje celic pod mikroskopom, ki pa je lahko dolgotrajno in subjektivno. Kot nadgradnja se uporablja barvanje celic, njihovo slikanje z digitalnim fotoaparatom in obdelava z računalniškimi programi. Slednje je včasih lahko nezanesljivo, saj v nekaterih primerih računalnik ne ločuje med porami filtra in celicami (Debeir in sod., 2004). Alternativa temu je posredna metoda, pri kateri je gostota barve sorazmerna celični migraciji. Celice se pobarva z barvilom kristal-vijolično, naredi se redčitve barvila in prenese se na mikroploščo za spektrofotometrične meritve (Santiago in Erickson, 2002). Hitrejši način ugotavljanja števila celic, ki migrirajo, je povezan s fluorescenco. Ob nadgraditvi Boydenove komore tako, da se prosojen filter zamenja za svetlobno neprepustnega, zazna fluorescentni odčitovalec le fluorescentno pobarvane endotelijske celice, ki so prišle skozi filter. Tako se šteje le migrirajoče celice, kar omogoča kvantifikacijo kemotakse (tj. od gradienta odvisna migracija) in kemokineze (tj. naključna gibljivost celic) (Goukassian in sod., 2001). Predpostavka, da je migracija celic na mesto ranitve način zdravljenja in celjenja ran, je porodila zamisel za novo metodo. Enosloj zraščanih celic se odstrani in nastane prazen prostor, kamor naj bi celice migrirale (Sl. 7). Opazujeta se stopnja in obsežnost celične migracije v določenih časovnih obdobjih pod mikroskopom (Pepper in sod., 1990). Kasnejše raziskave so pokazale, da ta metoda ni ravno natančna, saj je celjenje ran

večstopenjski proces, ki vključuje tudi proliferacijo, zato je neto migracijski učinek popačen (Auerbach in sod. 1991). S teflonsko pregrado se metodo izboljša, saj je celicam dovoljena rast le do določenega števila. Ob konfluentni rasti, kjer celice prerastejo celotno gojilno površino in so v medsebojnem stiku, se pregrada umakne in pritrjene celice pričnejo migrirati na nova, dosegljiva mesta. Vse to se spremlja v času in prostoru (Cai in sod., 2000). Želja po neposrednem merjenju celične migracije in učinkov nanjo je privedla do razvoja fagokinetske sledilne metode. Najprej je bil substrat koloidno zlato na krovnih stekelcih (Zetter, 1987), nato ga je izpodrinil enosloj polistirenskih kroglic v mikrotiterni plošči s 96 jamicami. Na enosloj se položi endotelijske celice, ki ob migraciji za seboj puščajo sled (Auerbach in sod., 2003). Slabe strani te metode so nenaraven substrat, zato se lahko sledi le malemu številu celic, metoda je dolgotrajna, analiza pa kljub dragi računalniški opremi ostaja težavna (Ariano in sod., 2005).



Slika 7: Migracija celic (Staton in sod., 2009: 200)

2.9.1.3 Diferenciacija endotelijskih celic

Metode za analizo diferenciacije endotelijskih celic so raznolike, vendar vse stimulirajo nastanek kapilaram podobnih cevok (ang. tubule-s) ter omogočajo ocenitev vpliva pro- in antiangiogenih faktorjev. Običajno se vpliv različnih modulatorjev spremlja od 4–24 ur z digitalno kamero. Celice se nasadi na sloj matriksa, ki stimulira njihovo pritrditev, migracijo in diferenciacijo v strukture podobne cevokam (Auerbach in sod., 2003). Uporablja se dvodimenzionalne in tridimenzionalne teste, ki se razlikujejo v izbiri matriksa (kolagen, fibronektin ali Matrigel) ter načinom angiogeneze (npr. fibronektin se uporablja za celjenje ran). Različni matriksi stimulirajo diferenciacijo na različne načine. Najbolj stimulatorni matriks za tvorbo cevok je Matrigel, ki izvira iz mišjega Engelbreth-Holm-Swarmovega sarkoma. Cevke se tvorijo po 1 uri, dokončno pa se oblikujejo po 12 urah. Zaradi pretirane stimulacije je na voljo tudi matriks Matrigel z manj citokini in rastnimi faktorji, a na splošno je uporaba omenjenega matriksa vprašljiva, saj pri njem dejanska tvorba kapilar še ni povsem potrjena in raziskana (Connolly in sod., 2002). Zaradi večje natančnosti rezultatov je priporočljiva izvedba testa na več kot enem matriksu. Stopnjo oblikovanja cevok se oceni na podlagi štirih parametrov, to so povprečna dolžina,

število in površina cevk ter število razvejitvenih mest (Lui in Kirn, 2008). Parametre se lahko oceni ročno ali s pomočjo računalniških programov. Pri slednjih se najpogosteje uporabljajo mikrotiterne plošče s 96 jamicami, ker so cenovno dostopnejše, čeprav je metoda prilagojena tudi za uporabo mikrotiternih plošč s 384 in 1536 jamicami, ki so natančnejše (Sanz in sod., 2002).

Z uporabo matriksov Matrigel, kolegen in fibrin se lahko ustvari tridimenzionalna (3D) metoda oblikovanja cevk, ki dobro posnema dogajanje *in vivo*. Endotelijske celice ležijo v sendviču med temi sloji matriksa, kjer se v sedmih dneh tvorijo cevčice v horizontalni ravnini. Do petnajstega dne pride do razvejitev in penetracij tudi v druge dele matriksa, kar se kaže kot 3D-oblika (Gagnon in sod., 2002). Aletnativno se to lahko ustvari tako, da se z endotelijskimi celicami prevleče kapljice in se jih nato razprši po gelu. Če kapljice ne potonejo na dno, se v sedmih dneh oblikujejo cevčice (Sun in sod., 2004). Slaba stran vseh 3D-metod je omejitve debeline gela, saj mora biti zagotovljena difuzija kisika in hranil. Čeprav se ta metoda približa dogajanjem *in vivo*, je analiza zelo zahtevna. Težave se pojavijo zaradi dimenzionalnosti v gelu; fotografije morajo biti posnete v različnih časovnih obdobjih v različnih globinah gela, lahko pa se analizira histološke preparate, vendar pa zahtevajo dolgotrajno pripravo (Gagnon in sod., 2002).

Posebna metoda za tvorbo cevk je sočasno gojenje endotelijskih in stromalnih celic, a je ta tehnično in časovno zahtevna (Donovan in sod., 2001). Na podoben način deluje gojenje endotelijskih celic na dvoslojnim matriksu. V spodnjem sloju se nahajajo fibroblasti s kolagenom, v naslednjem pa so brez kolagena. Na vrh so nasajene endotelijske celice, ki pa potrebujejo do dvajset dni za tvorbo cevk. Razvoj se spremlja z digitanim zajemom slike v kombinaciji s fazno-kontrastno mikroskopijo (Montesano in sod., 1993).

Spremembe v številu celic pri oblikovanju cevk se lahko spremlja z uporabo testa ELISA, kjer se povežeta alkalna fosfataza, vezana na protitelo CD31, ter topen kromogeni substrat (Friis in sod., 2003).

2.9.2 Raziskovanje angiogeneze z metodami *in vivo*

Metode *in vivo* so nadgradnja metod *in vitro*. Delo se opravlja na živem organizmu in je zahtevno že kot tako. Na modelnih organizmih (npr. cebrica, miši, zajci itd.) se izvajajo raziskave na roženici, horioalantoidni membrani (CAM), preko kamric ter različnih implantacij. Primerjave med različnimi testi so nezanesljive zaradi različnih postopkov dela in uporabljenega materiala. Ocenitev različnih agensov *in vivo* je pomemben postopek pri razvoju zdravil, ni pa nujno, da ob tem kaže podobne rezultate kot analize *in vitro*.

2.9.2.1 Test na horioalantoidni membrani

Zelo dostopna metoda je opazovanje angiogeneze pri piščancu preko jajčne lupine, natančnejše horioalantoidne membrane t. i. test CAM (ang. chick chorioallantoic membrane assay). Piščanec je živ fiziološki sistem, pri katerem se zlahka opazujejo lastnosti različnih celic, patogenov in farmakoloških reagentov. Je tudi zelo imunotoleranten, zato so študije

ksenograftov (npr. tumorjev, humanih rakastih celic ipd.) mogoče v daljšem časovnem obdobju. Dostop do horioalantoidne membrane je možen tako, da se razvitemu embriju izreže okence v jajčni lupini ali pa se embrio vzgaja v petrijevki brez lupine, zato se zlahka apliciratestne substance. Angiogeneza se spremlja tri dni po odvzemu horioalantoidne membrane okrog ksenografta ali filtrskega diska, kjer se s pomočjo mikroskopa štejejo žile in razvejitvena mesta, lahko pa se ocenjuje ožiljenost na semikvantitativni lestvici od 0–4 (Zijlstra in sod., 2006). Prednosti te metode so v njeni preprosti uporabi, nizki ceni, možnosti uporabe različnih vnosov, serijski aplikaciji ter uporabnosti pri biokemijskih analizah. Sočasno izstopajo nekatere slabosti, kot je razvojna angiogeneza embrija do desetega dne, kar pomeni, da izvedba testov do tedaj ni priporočljiva. Horioalantoidna membrana je občutljiva na spremembe tlaka kisika, zato se mora okence zapreti in nujno počakati tri dni po njenem nastanku, saj lahko morebitno vnetje sproži angiogenezo. Pred testiranjem je potrebno preveriti imunski odziv ali pa v filtrske diske dodati protivnetne agense. Slednje zaželeno, če je v danem primeru vnetje kot prožilec agensa nujno (Auerbach in sod., 2000).

2.9.2.2 Testi na roženici

Roženica je edino prosojno tkivo brez žil v telesu, zato so vse penetrirajoče žile iz limbusa v roženico nove tvorbe, ki se jih zlahka kvantificira. Neovaskularizacijo roženice sprožijo razne poškodbe, zato tudi metode za določanje angiogeneze slonijo na tem. Uporablja se kemijske in mehanske pristope, med katerimi se izpostavlja implantacija mikrožepkov s počasno sproščujočimi substancami (npr. citokinov, tumorskih celic, rastnih faktorjev ipd.) (Shan in Dewhirst, 2006). Preizkusi so se sprva odvijali na zajcih, šele nato na morskih prašičkih, podganah in miših. Tu je možno zdravljenje živali s testno substanco, ki se jo lahko aplicira sistemsko, topikalno (kot kapljice za oči) ali kot kombinacijo obojega (Shaw in sod., 2003). Za vizualizacijo žil se uporabi perfuzijo fluorescentnega barvila ali indijskega črnila, roženico se nato odstrani, položi na objektiva stekelca in slika pod mikroskopom. Neovaskularizacijo se lahko oceni kot pozitivno ali negativno, oziroma se natančneje kvantificira določene parametre, kot so področje ožiljenosti, obseg, dolžina in gostota žil ter premer kapilar. Metoda je zanesljiva, omogoča spremljanje več parametrov dalj časa pri eni živali, zato se jih žrtvuje manj, sama kvantifikacija pa je možna takoj. Slabosti metode se kažejo v ceni, saj je draga, tehniško in časovno zahtevna, možne pa so aktivacije različnih poti angiogeneze (Shan in sod., 2001).

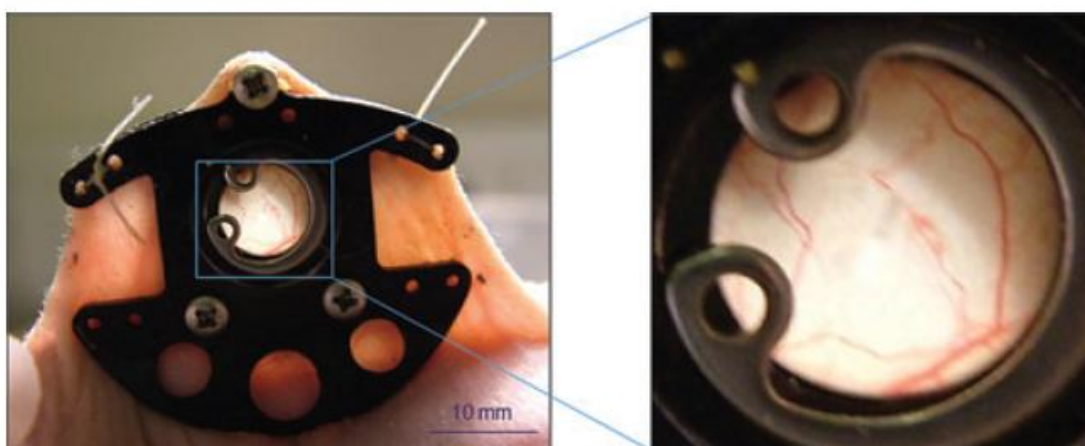
2.9.2.3 Dorzalno okno

Metoda dorzalnega okna je študije angiogeneze *in vivo* popeljala na višjo raven. Poznanih je nekaj vrst prozornih kamric, kot so ušesna kamrica, dorzalno in kranialno okno.

Priprava poteka tako, da se anestetizirani živali (pri ušesni kamrici ali dorzalnem oknu) odvzame košček kože ali lobanje (pri kranialnem oknu), na mesto brez tkiva se postavi tumorske celice ali angiogene faktorje, nato se izpostavljen del pokrije s steklom (Sl. 8). Po okrevanju živali omogoča metoda neprekinjene meritve različnih parametrov (Jain, 1997),

tudi spremljanje iste žile v daljšem časovnem obdobju (Menger in sod., 2002). Ušesna kamrica se uporablja pri zajcih za kvantifikacijo strukturnih in funkcionalnih sprememb tumorske neovaskulature (Gerlowski in Jain 1986). Zajčja ušesna kamrica je draga za rutinsko uporabo, prav tako je po operaciji potrebno počakati približno 5 tednov, da se lahko vstavi testno substanco.

Dorzalno okno, razvito predvsem za hrčke, podgane in miši, se uporablja za dokazovanje pomena angiogeneze za rast tumorjev in celjenje ran (Dellian in sod., 1996). Kvantifikacija rezultatov je neposredna, žival se glede na kamrico pravilno orientira pod mikroskopom. Testna področja se najprej posname z videokamero in se jih nato analizira z računalniškimi programi. Ta metoda omogoča 3D-rast žilja v posamezni živali tudi do treh tednov, zato se skupno žrtvuje manj živali. V nasprotju z zajcem je doba okrevanja le 48 ur. Možna je začasna odstranitev stekelca in naknadna implantacija transplantantov ali tumorskih celic (Laschke in sod., 2006). Slabosti metode sta omejena 3D-rast v eni smeri in včasih slabše vidne žile zaradi debeline kože. Prednosti kranialnega okna so v boljših možnostih transplantacije in hitrejši indukciji angiogeneze (Yuan in sod., 1994; Dellian in sod., 1996). Slaba stran vseh kamric je v njihovi invazivnosti in tehnični zahtevnosti.



Slika 8: Dorzalno okno (Staton in sod., 2009: 210)

2.10 HISTOLOGIJA

Najenostavnejši način preučevanja tkiv omogočajo histološki preparati pod mikroskopom. Histologija služi kot orodje za razumevanje zgradbe celic, tkiv in organov ter omogoča povezavo med strukturo in funkcijo tkiva. Idealni preparat bi imel na stekelcu enako zgradbo in molekulska strukturo kot v tkivu, a je to v praksi težje izvedljivo. Pri določanju natančne zgradbe in funkcije se uporablja mikroskop. Ta je lahko svetlobni, ki prikaže sliko v dveh dimenzijah, ali pa elektronski (EM; TEM (transmisijski EM) ali SEM (vrstični EM)) za natančnejše poglede. Histologija je poleg znanosti zelo zaželena v medicini za odkrivanje bolezni in njenega poteka. Večkrat služi tudi kot komplementarni del različnih molekularnih metod (Ross in Pawlina, 2006: 1-2).

Največkrat se za opazovanje krvnih žil uporablja protitelesa proti CD31. CD31 ali PECAM je trombocitna endotelijska adhezijska molekula, ki se nahaja v medceličnih povezavah med endotelijskimi celicami, poleg tega pa tudi na nekaterih krvnih celicah (Michelson, 2007 : 336). Tumorske endotelijske celice zadržijo izražanje CD31, zato je le-ta zelo primeren antigen za označevanje tumorskih žil (Mansel in sod., 2008: 120).

2.10.1 Postopek priprave preparata

Začetek priprave trajnega histološkega preparata predstavlja fiksacija. To je način preprečitve morfoloških sprememb, ki nastanejo zaradi delovanja hidrolitičnih encimov ob odmrtnosti celice ter bakterijskega razkroja. Fiksacija je lahko kemijska ali fizikalna. Pri fizikalni fiksaciji se uporabljata sušenje preparata pri sobni temperaturi ali zamrzovanje. Resda je fiksacija s sušenjem najenostavnejši način, a so tu rezultati najslabši, saj se zaradi upada nivoja vode in površinske napetosti v celicah spremeni njihova struktura. Ko je željeno opazovati strukture, ki bi jih kemijski fiksativi in višje temperature med pripravo uničili, se uporabi fiksacijo z zamrzovanjem. Izvede se hitro v tekočem dušiku ali v tekočem heliju, da ne nastanejo kristali ledu, ki bi lahko poškodovali celico (Bradamante in Kostović-Knežević., 2005 : 1).

Kemijska fiksacija je način vplivanja na proteinske komponente v celici, pri katerem se ustavi vse življenjske procese in obenem ohrani celično strukturo. Kot fiksative se najpogosteje uporablja tiste, ki zamrežijo proteinske molekule v citoplazmi (formaldehid, glutaraldehid), in tiste, ki denaturirajo proteine (etanol, metanol, očetna kislina). Idealni kemijski fiksativ ne obstaja, zato se uporablja različne mešanice, ki zmanjšajo število artefaktov. Wester in sod. (2003) so ugotovili, da je za boljšo ohranitev DNA, RNA, proteinov in antigenov bolje uporabiti cinkov fiksativ namesto formaldehida. To se občutno opazi predvsem pri ohranitvi epitopov epitelijskega kadherina, CD31, EGFR, HER-2 in citokeratina.

Poleg same kemijske sestave fiksativa so pomembni še temperatura, pH, ozmolarnost fiksativa in čas fiksacije. Fiksaciji sledi izpiranje tkiva z izotoničnim fosfatnim pufrom (ang. phosphate buffered saline, PBS), postopna dehidracija z alkoholi naraščajočih koncentracij ter bistrenje s ksilolom. Tak vzorec se prenese v staljen parafin v termostat (kjer je 50–60 °C) za nekaj časa (od 30 min do celega dne). Tkivo, prepojeno s parafinom, se nato ohladi in strjen blok je nared za rezanje. Z mikrotomom se nareže poljubno debele (5-20 µm) histološke rezine, ki se jih prenese s površine noža na toplo vodo (50 °C), kjer se raztegnejo. Od tod se jih pobere na objektna stekla, ki se jih ustrezno etiketira (Bradamante in Kostović-Knežević., 2005: 2).

Pred barvanjem dobljenih rezin, se mora najprej odstraniti parafin. To se doseže s ksilolom in padajočimi koncentracijami etanola. Sledi prenos v vodo ali PBS, naprej pa je postopek odvisen od vrste barvanja. Obarvan preparat se znova dehidrira z naraščajočimi koncentracijami alkoholov in na koncu se alkohol zamenja s ksilolom. Tedaj se na preparat kane kapljica kanadskega balzama (ki ima enak lomni količnik kot steklo) ali sintetične

smole ter se ga pokrije s krovnim stekelcem. Preparat je tedaj pripravljen za analizo (Veranič in sod., 2003: 24).

Parafinskih rezin se ne more uporabljati povsod, saj njihova priprava popači določene sestavine celice, kot so lipidi in encimske aktivnosti. Kot alternativo se tu uporablja zaledenele rezine, kjer se kemijsko fiksirano tkivo potopi v kapljo vode ali v hidrofilen medij in se ga zmrzne. Tako pripravljeno tkivo se reže v kriostatu, ki je hlajena aparatura z mikrotomom, pri -25 do -30 °C. Z objektnim stekelcem se dotakne odrezane rezine tkiva, ki se takoj razpre. Preparat je tako že pripravljen za barvanje (Veranič in sod., 2003: 24).

2.10.2 Imunohistokemija (IHC)

S pomočjo protiteles se da ugotavljati prisotnost različnih celičnih sestavin. Molekule, na katere se protitelesa vežejo, so antigeni. Metoda je zelo natančna, saj se lahko za vsak antigen proizvede določeno protitelo. Pri histologiji se za ta način barvanja uporablja fiksacija z zmrzovanjem ali z rahlimi kemijskimi sredstvi (npr. cinkov fiksativ). Po obdelavi se preparate inkubira s primarnimi protitelesi, saj so ta specifična za določen tkivni antigen. Na primarni antigen je lahko neposredno vezan označevalec. V tem primeru govorimo o neposredni (direktni) metodi označevanja, ali pa neoznačeno primarno protitelo služi kot antigen drugemu označenemu sekundarnemu in/ali terciarnemu protitelesu. V tem primeru govorimo o posrednem (indirektnem) označevanju (ali indirektni metoda). Označevalci so lahko fluorescentna barvila, encimi, koloidno zlato ipd. (Ramos-Vara, 2005).

Neodvisno od načina fiksacije so antigeni v tkivu lahko skriti ali nedostopni zaradi intra- in intermolekularnih povezav, zato jih je pri imunohistokemiji (IHC) pred barvanjem preparatov pomembno sterično izpostaviti. Pri slednjem najpogosteje se uporabljata encimska razgradnja ali odkritje epitopov s pomočjo toplote (mikrovalovna pečica, avtoklaviranje, kuhanje pod visokim pritiskom) (de Matos in sod., 2010). Pri encimski razgradnji se uporabljata encima pepsin in tripsin, ki morata biti v ustrezni koncentraciji in pod optimalnimi pogoji (temperatura, pH, dodatek koencimov in čas trajanja). Način delovanja toplote pri izpostavljanju antigenov še danes ni povsem poznan. Predvideva se, da v tem primeru pride do prekinitev različnih vezi ali pa do obarjanja določenih proteinov. Ne glede na to, kakšen je dejansko mehanizem, je tudi tu potrebno zagotoviti ustrezen pH in sestavine raztopine za izpostavljanje antigenov. Običajno prevladujejo posredne metode označevanja kot sta peroksidaza antiperoksidaza (PAP) in avidin-biotin kompleks (ABC) (Ramos-Vara, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 OD ŽIVALI DO TKIVA

3.1.1 Živali in tumorji

Vse študije na živalih so bile izvedene v moji prisotnosti in v prisotnosti raziskovalcev, usposobljenih za tovrstno delo, ter v skladu s smernicami za poskuse na živalih z direktivami EU in dovoljenjem Veterinarske uprave Ministrstva za kmetijstvo in okolje Republike Slovenije (dovoljenje št.: 34401-12/2009/6). Pri poskusih smo uporabili samice BALB/C miši, stare 6–8 tednov, kupljene na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (Slovenija). Miši so bile pred vključitvijo v poskus najmanj 2 tedna v karanteni. Gojili smo jih v specifičnih patogenov prostem okolju s stalno sobno temperaturo, vlažnostjo ter 12 urnim dnevno-nočnim ciklom. Hrana in voda sta bili dodani *ad libitum*.

Za indukcijo podkožnih tumorjev smo v desni bok miši injicirali suspenzijo tumorskih celic TS/A 2×10^6 (mišji mamarni adenokarcinom), pripravljeno iz *in vitro* kulture v 0,1 mL fiziološke raztopine. Ko so tumorji zrastle do 3 mm^3 , kar se je običajno zgodilo v času 4–5 dni po podkožni injekciji celic, smo živali naključno razdelili v poskusne skupine (Pregl. 1) in izpostavili specifičnim raziskovalnim postopkom. V posamezne skupine smo vključili od 9–11 živali.

Preglednica 1: Pomen kratic terapevtskih skupin (EP-elektroporacija, siRNA-mala interferenčna RNA, H₂O-voda).

Table 1: Division of therapeutic groups (EP-electroporation, siRNA-small interference RNA, H₂O-water).

Kratica	Pomen
Kontrola	Živali so bile brez terapije; injiciranja in EP
EP	Pred EP smo živalim injicirali H ₂ O.
m_siRNA 869	Živalim smo injicirali le terapevtsko siRNA proti endoglinu.
m_siRNA 869 + EP	Živalim smo injicirali terapevtsko siRNA proti endoglinu in izvedli EP.
siRNA Ctrl	Živalim smo injicirali negativno kontrolo siRNA.
siRNA Ctrl + EP	Živalim smo injicirali negativno kontrolo siRNA in izvedli EP.

3.1.2 Molekule siRNA

S pomočjo programa »BLOCK-iT™ RNAi DESIGNER« (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) smo izbrali tri molekule siRNA, tarčne za različne dele kodirajočih sekvenc humanega in mišjega endoglina. Po zagotovilih proizvajalca je negativna kontrola nehomologna vsem znanim vretenčarskim transkriptom. V *in vitro* poskusih smo testirali, katera od izbranih siRNA najbolj učinkovito utiša izražanje endoglina. Za najbolj uspešno se je izkazala m_siRNA 869, ki smo jo uporabili v poskusih na laboratorijskih miših.

Molekule siRNA so prispele kot očiščene, že prilagajajoče se molekule, razredčene do koncentracije 20 μM v sterilnem dietilpirokarbonatu (DEPC) s H_2O .

3.1.3 *In vivo* elektrotransfekcija

Elektrotransfekcijo *in vivo* smo izvajali enkrat ali trikrat, vsak zaporedni dan. V tumorje smo najprej injicirali 40 μL m_siRNA 869, takoj zatem sprožili še električne pulze (8 pravokotno privedenih na podlago z amplitudo 240 V (amplitude v razmerju oddaljenosti 600 V/cm), dolžine 5 ms pri frekvenci 1 Hz) (m_siRNA 869 + EP skupina). Električne pulze je proizvajal generator GT-01 (Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, Slovenija) ter jih pošiljal skozi 2 vzporedni elektrodi iz nerjavečega jekla. Elektrodi sta bili medseboj oddaljeni 4 mm. Mišim v kontroli skupini smo v tumor injicirali H_2O . Mišim v skupini EP pa smo po injiciranju H_2O na tumor dovedli električne pulze. V skupini m_siRNA 869 smo mišim intratumorsko injicirali 40 μL m_siRNA 869, v skupini siRNA Ctrl, ki je negativna kontrolna skupina, pa smo intratumorsko injicirali m_siRNA Ctrl. Mišim v skupini m_siRNA Ctrl + EP smo poleg intratumorskega injiciranja kontrole siRNA dovedli še električne pulze na tumor.

3.1.4 Rast tumorja

Terapevtski učinek elektrotransfekcije molekul m_siRNA proti mišjemu endoglinu smo ugotavljali z vsakodnevnim merjenjem velikosti tumorjev s pomočjo digitalnega kljunastega merila. Volumen tumorja smo izračunali po sledeči formuli: $V = a \times b \times c \times \pi/6$, kjer so a, b in c pravokotni tumorski premeri. Potrojitevni čas volumnov tumorjev smo dobili s pomočjo tumorske rastne krivulje. Sočasno smo spremljali težo živali, da bi zaznali morebitne stranske učinke.

3.2 OD TKIVA DO PREPARATA

3.2.1 Priprava tkivnih rezin – mišje srce, tumorsko tkivo

Iz vsake eksperimentalne skupine smo 2 dni po koncu terapije žrtvovali 2-3 živali in odvzeli tumorje za nadaljnjo histološko analizo. Odvzete tumorje smo v celoti fiksirali v cinkovem fiksativu, 24 ur pri sobni temperaturi (BD PharmingenTM, BD Biosciences).

Po fiksaciji smo izolirane tumorske vzorce dehidrirali v alkoholu rastočih koncentracij (70%, 90%, 100%), bistrili v ksilolu in nato vkloplili v staljeni parafin. Iz vsakega parafinskega bloka je bila s pomočjo mikrotoma (Thermo Scientific, Microm HM 340E) narezana serija 5 μm debelih parafinskih rezin. Rezine so bile pritrjene na objektna stekelca. Po ena parafinska rezina je bila pobarvana histokemično s hematoksilinom in eozinom, preostale rezine pa so bile uporabljene za imunohistokemično barvanje.

Za imunohistokemično barvanje smo rezine deparafinirali v ksilolu in jih rehidrirali v vrsti padajočih koncentracij alkohola (100%, 90%, 70%) ter jih sprali v PBS. Antigene smo izpostavljali s segrevanjem v mikrovalovni pečici v citratnem pufri (pH 6,0) 5-krat po 5

min pri največji jakosti (800 W), tkivne rezine pa smo nato ohladili na sobno temperaturo. Endogeno peroksidazo smo blokirali s pomočjo 3% vodikovega peroksida v metanolu. Sledila je inkubacija tako pripravljenih rezin s primarnimi protitelesi. Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili, in proizvajalci ter razredčitve so prikazani v preglednici 2. Testirali smo več različnih časov inkubacije primarnih protiteles.

Preglednica 2: Seznam primarnih protiteles proti CD31.

Table 2: List of primary antibodies against CD31.

Primarna protitelesa	Proizvajalec	Redčitve
Podganja proti mišjem CD31 (ang. Rat Anti-Mouse CD31)	Abd Serotec, Kidlington, VB	1 : 50
		1 : 100
	BD Pharmigen™, San Diego, CA, ZDA	1 : 50
	Abcam, Cambridge, VB	1 : 50
		1 : 100

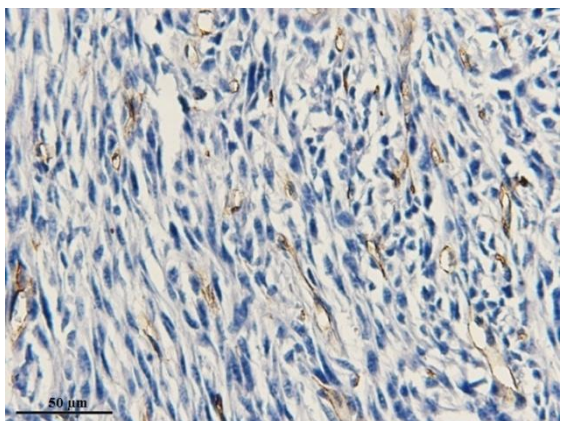
Kot sekundarno protitelo smo uporabili biotinizirano poliklonsko zajčje protitelo različnih proizvajalcev (Pregl. 2). Vezavo protiteles smo prikazali s pomočjo streptavidina in barvni prikaz vezave s pomočjo diaminobenzidina in vodikovega peroksida. Preparate smo nato kontrastirali s hematoksilinom, jih dehidrirali in vklopili s pomočjo kanadskega balzama (Merck KGaA, Nemčija) ter jih pokrili.

Pri vseh imunohistokemičnih barvanjih smo uporabljali ustrezne pozitivne in negativne kontrole. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili tkivne vzorce mišjega srca, ki smo jih barvali po enakem postopku kot tumorske vzorce. Kot negativno kontrolo smo uporabili tumorske vzorce, ki pa smo jih namesto s primarnim protitelesom inkubirali le s PBS.

3.3 ANALIZA SLIKE

IHC obarvane preparate smo opazovali s svetlobnim mikroskopom BX-51 (Olympus, Hamburg, Germany), na katerega je bila priključena digitalna kamera DP72 (Olympus, Hamburg, Nemčija). Slikali smo 6 naključno razporejenih predelov tumorja v viabilnem delu tumorja. Slike histoloških preparatov smo analizirali s programom AxioVision (Carl Zeiss, Jena, Nemčija). Analizo smo izvedli v več korakih, tako da smo slike, zajete v barvni lestvici RGB (rdeča, zelena, modra – red, green, blue) spremenili v binarne slike, ki so predstavljale natančen posnetek (masko) krvnih žil v tumorskem vzorcu. Binarno sliko smo dobili tako, da smo najprej določili RGB-pragovno vrednost piksla, ki je določal rjavo barvo, značilno za s protitelesi proti CD31 označena področja. Ta področja so predstavljala grobi obris krvnih žil. Za izboljšanje kvalitete maske in izločitev področij, ki so bila nespecifično označena, smo izbrisali vsa zaznana področja manjša od $1 \mu\text{m}^2$. Nato smo grobi obris krvnih žil ročno popravili z grafično tablico (Genius, Tajpej, Tajvan), da smo dobili njihov natančen obris. Tako dobljeni natančni obris smo v programu AxioVision

(Carl Zeiss) spremenili v binarno sliko (masko krvnih žil), kjer je bela barva predstavljala krvne žile, črna pa ozadje (tumorsko tkivo) (Sl. 9, 10, 11, 12). Na dobljenih maskah smo določili število krvnih žil in njihove premere. V nadaljnji analizi smo upoštevali samo krvne žile, katerih premer je bil manjši od 30 μm .



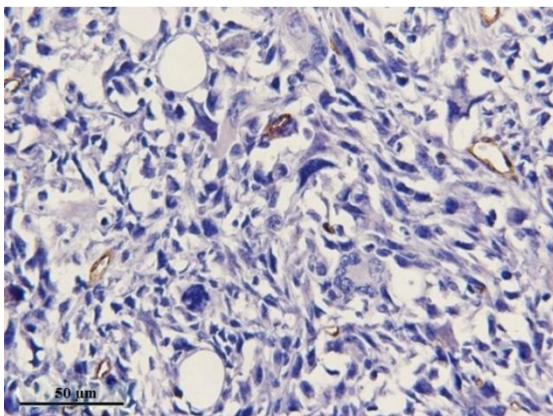
Slika 9: Krvne žile pobarvane proti CD31 v nezdravljenih tumorjih (Abcam), redčitev 1 : 100.

Figure 9: Blood vessels stained against CD31 in non treated tummor (Abcam), dilution 1 : 100.



Slika 10: Binarna slika tumorskih žil kontrolne skupine po obdelavi.

Figure 10: Binary mask image of tumor vessels in the controle sample.



Slika 11: Krvne žile pobarvane proti CD31 v tumorjih zdravljenih z m_siRNA 869 in EP (Abcam), redčitev 1 : 100.

Figure 11: Blood vessels stained against CD31 in tummor tretaed with m_siRNA 869 and EP (Abcam), dilution 1 : 100.



Slika 12: Binarna slika tumorskih žil terapevtske skupine po obdelavi.

Figure 12: Binary mask image of tumor vessels in the treated sample.

3.4 STATISTIKA

Za vse podatke smo preverili normalno distribucijo s pomočjo Shapiro-Wilkovega testa. Razlike med eksperimentalnimi skupinami smo statistično ocenili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) ter Holm-Sidakovim testom za množično primerjavo. Za statistično pomembne rezultate smo šteli tiste, ki so imeli P-vrednosti pod 0,05. Za statistično analizo in grafične prikaze smo uporabili SigmaPlot Software (Systat Software, Chicago, USA).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA PROTOKOLA ZA BARVANJE TUMORSKIH KRVNIH ŽIL

V prvem delu magistrske naloge smo želeli vzpostaviti optimalni protokol barvanja tumorskih krvnih žil. Testirali smo različna protitelesa proti CD31 različnih proizvajalcev in različne postopke barvanja. Imunohistokemično barvanje smo izvajali na vzorcih mišjega mamarnega adenokarcinoma TS/A. Za pozitivno kontrolo smo imeli ali vzorec mišjega srca ali tumorsko tkivo, negativno kontrolo pri vseh različnih postopkih barvanja pa nam je predstavljal vzorec tumorskega tkiva inkubiran brez primarnih protiteles.

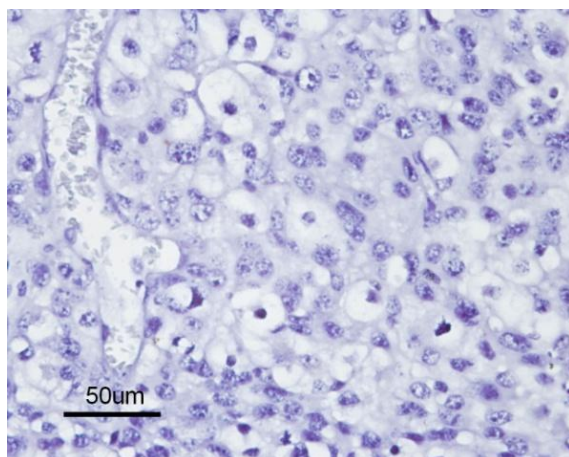
V vseh primerih smo postopek barvanja vzorcev pričeli z deparafinizacijo s ksilolom in rehidracijo v padajočih koncentracijah etanola (100%, 96% in 70%). Morebitne sterične ovire tkivnih antigenov smo odstranjevali s segrevanjem v mikrovalovni pečici v Nacitratnem pufru z dodatkom detergenta Tween. Po ohlajanju smo reakcijo na preparatu ustavili s 3% vodikovim peroksidom ali z že pripravljeno mešanico Hydrogen Peroxide Block (Rabbit specific HRP/DAB detection IHC Kit; Abcam). Preparatu, pri katerem smo uporabili omenjeni komplet reagentov, smo dodali še mešanico Protein Block (Abcam). Sledila je inkubacija preparatov s primarnimi protitelesi v mini vlažni komori preko noči na 4°C ali 2 urna inkubacija na 20 °C. Od tu dalje smo potek barvanja spreminjali, zato je razložen pri vsakem protitelesu posebej. Šele v stopnji dehidracije tkiva, je bil postopek ponovno poenoten. Po barvanju s hematoksilinom smo preparat v banjici spirali z vodo, nakar smo ga dehidrirali z naraščajočimi koncentracijami etanola (70, 96 ter 100%) ter bistrili v ksilolu. Na preparat smo kanili kapljico kanadskega balzama (Merck KGaA, Nemčija) ter nanj položili krovno stekelce. Tako pripravljene preparate smo opazovali in analizirali s svetlobnim mikroskopom. Pri vseh skupinah smo sočasno naredili še pozitivno in negativno kontrolo.

4.1.1 Primarna protitelesa proizvajalca Abd Serotec

Kot prvega proizvajalca primarnih protiteles smo vzeli Abd Serotec (Kidlington, VB). Uporabili smo različni koncentraciji protiteles (1 : 50 ter 1 : 100) ter spodaj navedene reagente.

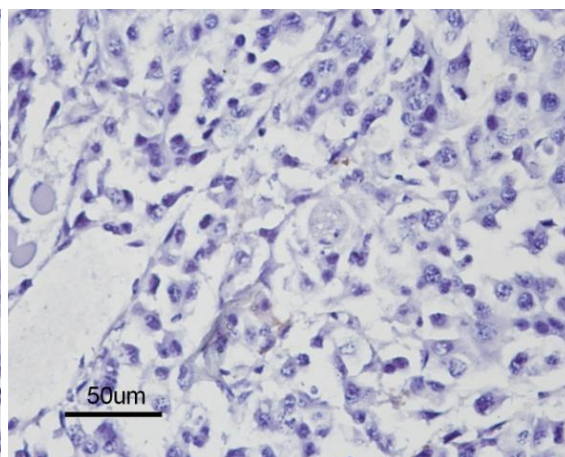
Po inkubaciji preparata s primarnimi protitelesi (1 : 50 ter 1 : 100) preko noči na 4°C, smo dodali sekundarna protitelesa (DAKO, Glostrup, Danska) ter mešanico streptavidin-HRP (DAKO). Po inkubaciji smo na preparat kanili še mešanico pufru DAB in kromogena (DAKO) ter ga nato barvali s hematoksilinom. Poiskusili smo tudi zamenjati mešanico pufru DAB in kromogena z mešanico reagentov B (H₂O₂ + pufer) in C (DAB) (DAKO). Redčitev protiteles je bila v tem primeru 1 : 50.

Opazili smo, da se krvne žile niso obarvale ne v tumorju TS/A (Sl. 13 in 14) in ne v mišjem srcu. Pozitivna in negativna kontrola sta dokaz za neuspešno barvanje (Sl. 15 in 16).



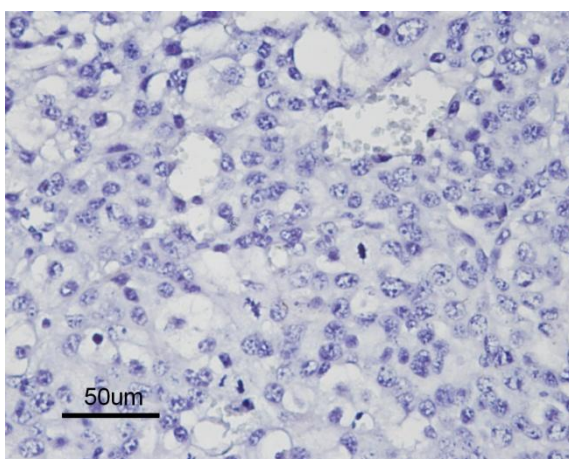
Slika 13: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 50.

Figure 13: TS/A tummor tissue stained against CD31 (Abd Setotec), dilution 1 : 50.



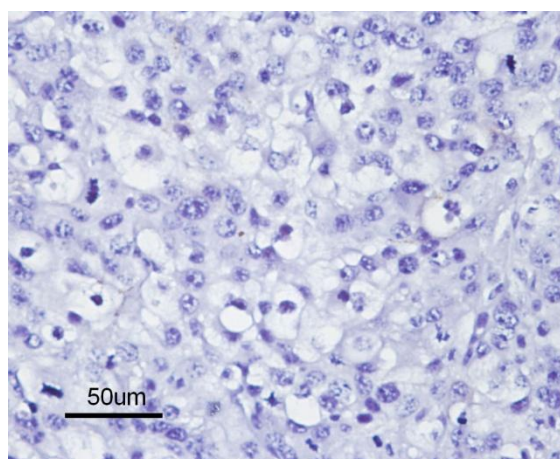
Slika 14: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 100.

Figure 14: TS/A tummor tissue stained against CD31 (Abd Setotec), dilution 1 : 100.



Slika 15: Pozitivna kontrola, tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abd Serotec), redčitev 1 : 50.

Figure 15: Positive control, TS/A tummor tissue stained against CD31 (Abd Serotec), dilution 1 : 50.



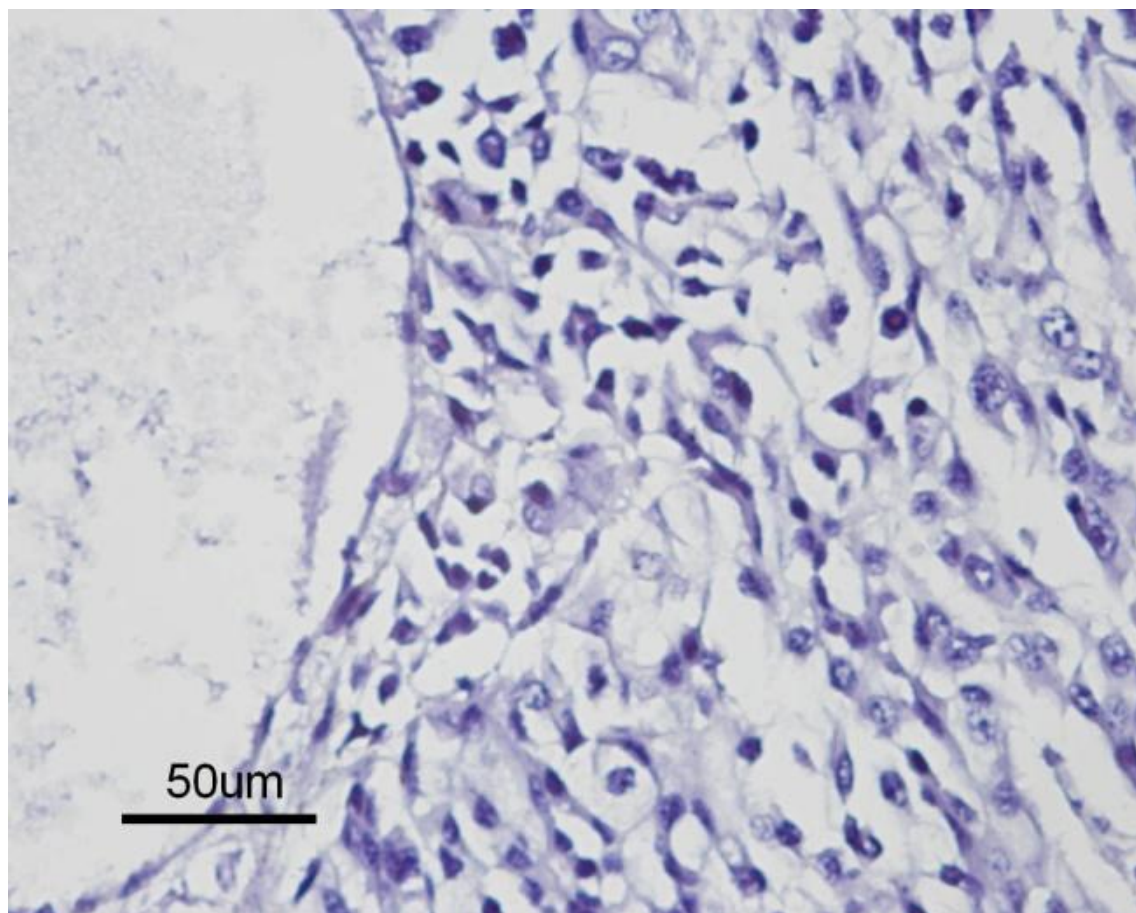
Slika 16: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.

Figure 16: Negative control, TS/A tummor tissue with no primary antibodies.

4.1.2 Primarna protitelesa proizvajalca BD Pharmigen™

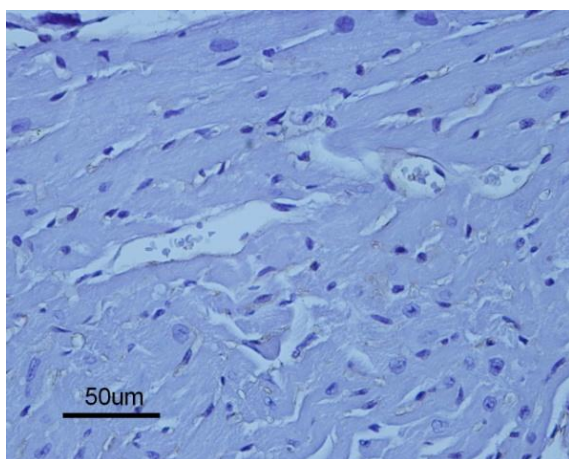
Postopek priprave in barvanja preparatov je ostal enak predhodnemu, razlika je bila le v primarnih protitelesih proizvajalca BD Pharmigen™ (San Diego, CA, ZDA). Protitelesa smo redčili 1 : 50.

Uporabili smo sekundarna protitelesa (DAKO), mešanico streptavidin-HRP (DAKO) ter mešanico pufra DAB in kromogena (DAKO). Tudi tu nismo dobili pozitivne reakcije, kar kaže, da se tudi v tem primeru primarna protitelesa niso vezala na antigen (Sl. 17, 18, 19).



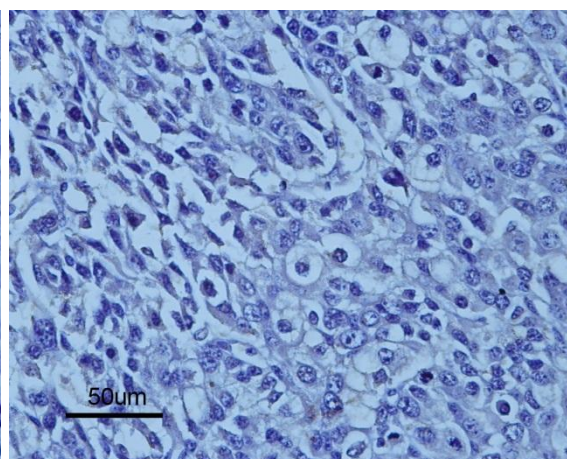
Slika 17: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (BD Pharmigen™), redčitev 1 : 50.

Figure 17: TS/A tummor tissue stained against CD31 (BD Pharmigen™), dilution 1 : 50.



Slika 18: Pozitivna kontrola, tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (BD Pharmigen™), redčitev 1 : 50.

Figure 18: Positive control, mouse heart tissue stained against CD31 (BD Pharmigen™), dilution 1 : 50.



Slika 19: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.

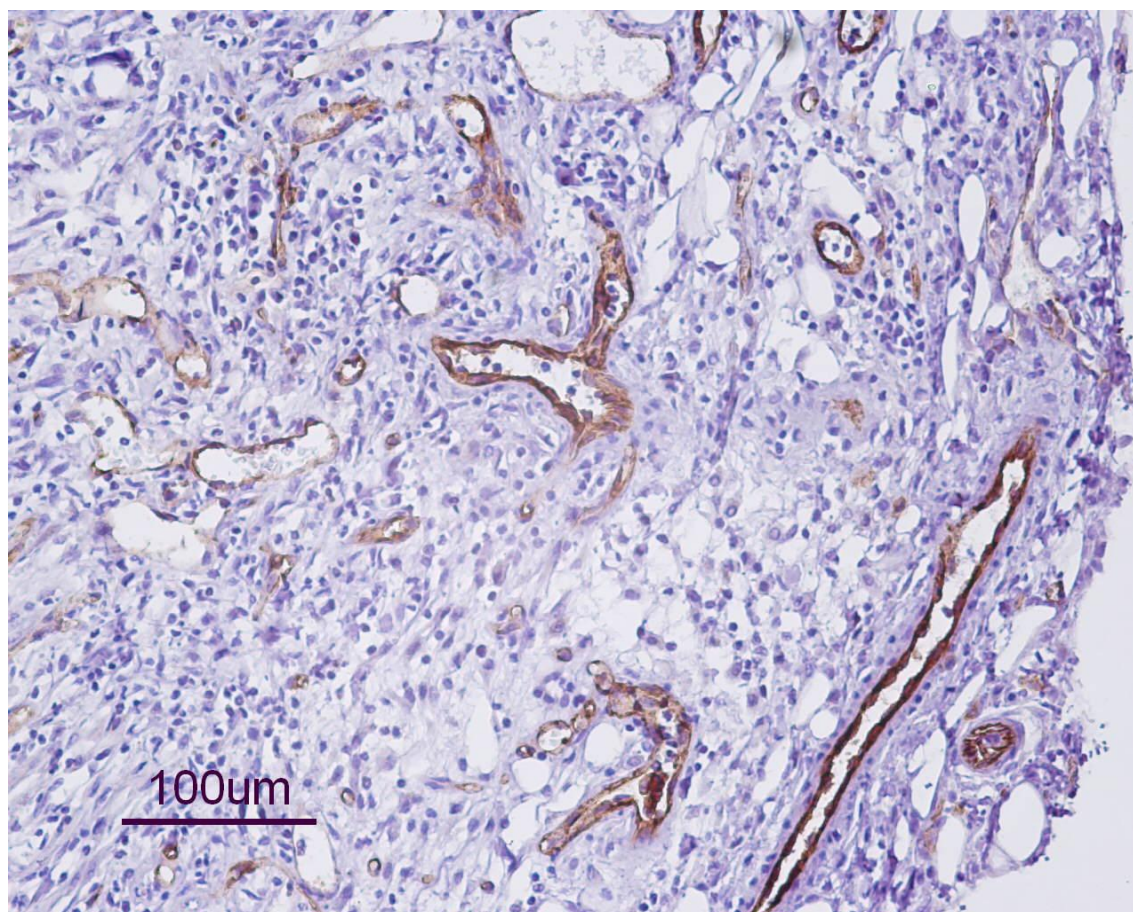
Figure 19: Negative control, TS/A tummor tissue with no primary antibodies.

4.1.3 Primarna protitelesa proizvajalca Abcam

Barvati smo poskusili tudi s primarnimi protitelesi podjetja Abcam (Cambridge, VB) in njihovim kompletom reagentov (Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit, Abcam, Cambridge, VB).

Preparate smo barvali z različnimi redčitvami protiteles (1 : 50 ter 1 : 100). Poskusili smo tudi z različnimi časi izpostavljanja antigenov (5-krat 5 min ter namakanje v predhodno zavretem citratnem pufru, ki se je nato 40 min ohlajal pri sobni temperaturi (t. i. ohlajajoči se pufer) ter različno dolge inkubacije preparatov s primarnimi protitelesi (čez noč na 4°C ali 2 uri pri sobni temperaturi).

V splošnem so se ta primarna protitelesa v kombinaciji s kompletom izkazala kot najuspešnejša. Pri standardnem postopku so se pobarvale vse žile tkiv že pri redčitvi 1 : 100 (Sl. 20).



Slika 20: Tumorsko tkivo TS/A, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 100.

Figure 20: TS/A tummor tissue stained against CD31 (Abcam), dilution 1 : 100.

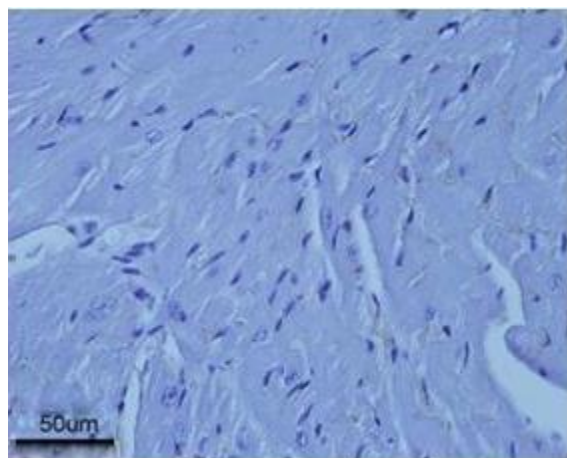
Izpostavljanje antigenov v ohlajajočem se pufru se je izkazalo za manj uspešno od standardne toplotne obdelave preparatov v mikrovalovni pečici, saj se v tem primeru niso pobarvale vse žile mišjega srca (Sl. 21). Prav tako se ni najbolje izkazala 2-urna inkubacija

primarnih protiteles pri sobni temperaturi, saj so tudi pri redčitvi 1 : 50 nekatere žile ostale nepobarvane (Sl. 22).



Slika 21: Tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 50, s 40 min namakanjem v ohlajajočem se citratnem pufru.

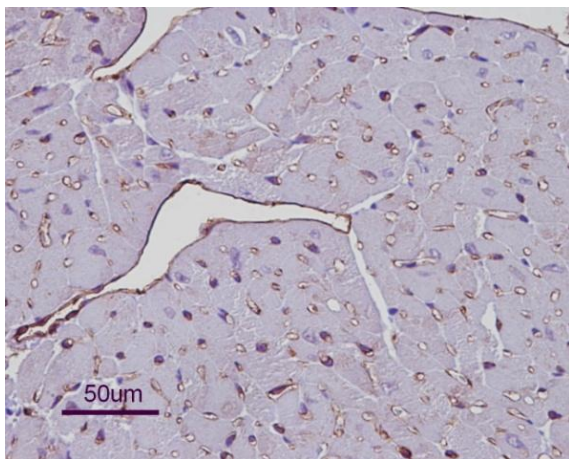
Figure 21: Mouse heart tissue stained against CD31 (Abcam), dilution 1 : 50, with 40 min cooling in citrate buffer.



Slika 22: Tkivo mišjega srca, pobarvano proti CD31 (Abcam), redčitev 1 : 50, inkubacija primarnih protiteles 2 uri pri sobni temperaturi.

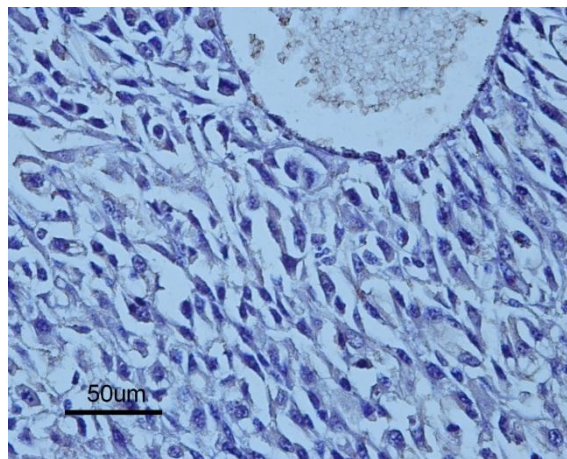
Figure 22: Mouse heart tissue stained against CD31 (Abcam), dilution 1 : 50, 2h of incubation with primary antibodies at room temperature,

Vezava protiteles proti CD31 (Abcam) se lepo vidi tudi pri pozitivni in negativni kontroli. Pri pozitivni kontroli so se krvne žile obarvale rjavo in lepo se jih loči od okoliškega tkiva (Sl. 23). Pri negativni kontroli nismo opazili obarvanja žil ali okoliškega tkiva (Sl. 24).



Slika 23: Pozitivna kontrola, tkivo mišjega srca pobarvano proti CD31 (Abcam), redčeno 1 : 100.

Figure 23: Positive control, mouse heart tissue stained against CD31 (Abcam), dilution 1 : 100.



Slika 24: Negativna kontrola, tumorsko tkivo TS/A brez primarnih protiteles.

Figure 24: Negative control, TS/A tumor tissue with no primary antibodies.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo preparate, na katerih smo predhodno izvajali terapijo, pobarvali z Abcamovimi protitelesi in kompletom, redčitve 1 : 100.

Po optimizaciji metode glede na uporabljena protitelesa, načina izpostavljanja antigenov, časa inkubacije in dobljene rezultate smo vzpostavili protokol barvanja tumorskih krvnih žil.

4.2 IHC-PROTOKOL BARVANJA PROTI CD31

1. DAN

- Preparat inkubiramo pri 37°C čez noč, da se parafin rahlo omehča (za lažje barvanje).

2. DAN

1. DEPARAFINIZACIJA

- Ksilol–15 min.
- 100% etanol–10 min.
- 96% etanol–10 min.
- 70% etanol–10 min.
- 1xPBS 5 min.

2. IZPOSTAVLJANJE ANTIGENOV

- V mikrovalovni segrejemo banjico z 10 mM Na-citratnim pufrom z dodatkom detergenta Tween do vretja
- Preparat prenesemo v banjico in ga v mikrovalovni pečici segrevamo pri največji jakosti (npr. 800 W) 5-krat po 5 min. Ob tem pazimo, da pufer ne vre premočno ter da ne izpari do takšne mere, da ne prekriva več preparatov.
- Banjico s preparatom 20 min hladimo pri sobni temperaturi.
- Inkubiramo v 1xPBS 5 min.
- Stekelce okrog tkiva obrišemo in nanje kanemo reagent »Hydrogen Peroxide Block« in inkubiramo 10 min.
- Inkubiramo v 1xPBS 20 min.
- Stekelce okrog tkiva obrišemo in dodamo kemikalijo »Protein Block« za 5 min.
- Inkubiramo 10 min v 1xPBS.

3. DODAJANJE PROTITELES

- Stekelce okrog tkiva obrišemo in dodamo primarna protitelesa redčena v razmerju 1 : 100.
- Preparat prenesemo v »vlažno komoro« in inkubiramo preko noči pri 4 °C.

3.DAN

- Iz preparata odlijemo primarna protitelesa na brisačko.
- Preparat inkubiramo v 1xPBS 10 min pri sobni temperaturi.
- Stekelce okrog tkiva obrišemo in dodamo z biotinom označena kozja protitelesa (»Biotinilated goat anti rabbit IgG«) za 10 min pri sobni temperaturi.
- Odlijemo raztopino sekundarnih protiteles na brisačko (na isto mesto, kot smo odlili primarna protitelesa).
- Inkubiramo v 1xPBS 10 min pri sobni temperaturi.
- Obrišemo stekelce okrog tkiva in nanj nakapamo reagent »Streptavidin Peroxidase« ter inkubiramo pri sobni temperaturi za 10 min.
- Reagent odlijemo na brisačko (na mesto, kamor smo že odlili primarna ter sekundarna protitelesa).
- Inkubiramo v 1xPBS 10 min pri sobni temperaturi.
- Obrišemo stekelce okrog tkiva, dodamo mešanico DAB substrate in DAB chromogen ter inkubiramo 10 min pri sobni temperaturi.
- Odlijemo na brisačko (na isto mesto kot do sedaj, tako preverimo delovanje reagentov).
- Preparat prenesemo v 1xPBS za 15 min, pri sobni temperaturi.
- Stekelce okrog tkiva obrišemo in prenesemo v kadičko napolnjeno s hematoksilinom za 1 min.
- Preparat prenesemo v v kadičko napolnjeno z vodo. Iz te kadičke prenesemo preparat v novo kadičko napolnjeno z vodo, da speremo hematoksilin. Postopek prenašanja preparata v nove kadičke ponavljamo vse dokler se voda v kadički po vnosu preparata ne obarva več.

4. DEHIDRACIJA

- 70% etanol – 5 min.
- 96% etanol – 5 min.
- 100% etanol – 5 min.
- Ksilol 5 min.

5. PRIPRAVA PREPARATA

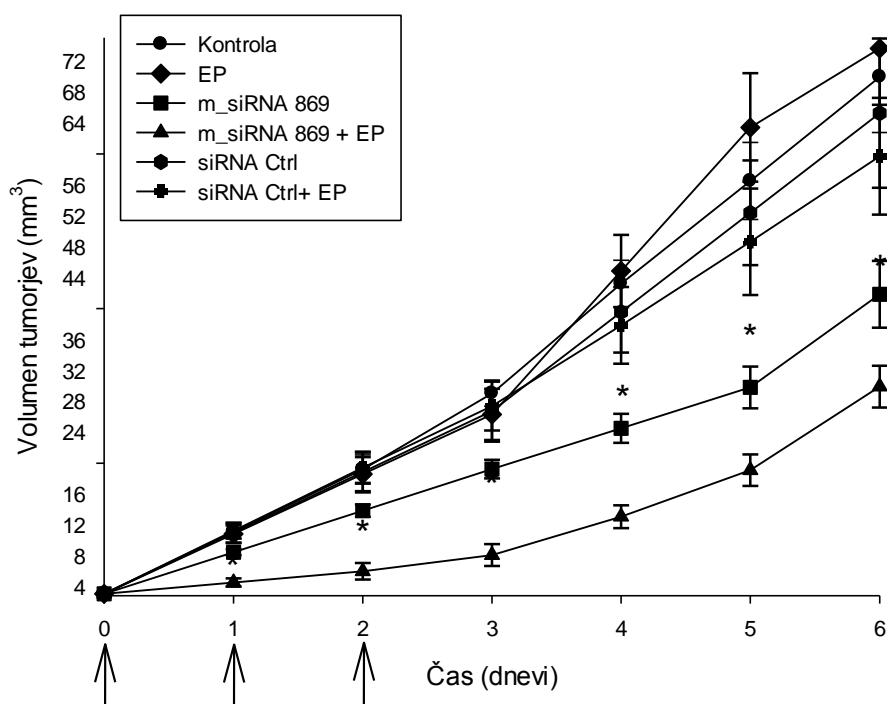
- Stekelce okrog tkiva obrišemo.
- Na preparat kanemo kanadski balzam in nanj previdno položimo krovno stekelce.

4.3 UGOTAVLJANJE PROTITUMORSKEGA UČINKA TERAPIJE

V drugem delu magistrske naloge smo uporabili optimiziran protokol za imunohistokemično barvanje tumorskih žil za barvanje žil v tumorjih TS/A po elektrogenski terapiji z m_siRNA proti endoglinu. Utišanje endoglina v tumorskih žilah naj bil preprečilo rast teh žil in s tem upočasnilo rast tumorjev. Protitumorski učinek smo določali z merjenjem rasti tumorjev ter z določanjem gostote tumorskih krvnih žil na histoloških preparatih tumorjev odvzetih 24 ur po zadnji terapiji.

4.3.1 Merjenje rasti tumorja

Tumorji, ki so bili zdravljeni s 3-kratno elektrogensko terapijo, so rastle počasneje kot tumorji v kontrolni skupini. Velikost tumorjev je bila statistično značilno manjša že prvi dan po prvi terapiji. Iz rastle krivulje tumorjev je razvidno, da se je rast tumorjev po zaključku terapije nadaljevala z enako hitrostjo kot pri tumorjih v kontrolni skupini, kar pomeni, da je terapevtski učinek molekul siRNA proti endoglinu kratkotrajen (Sl. 25).

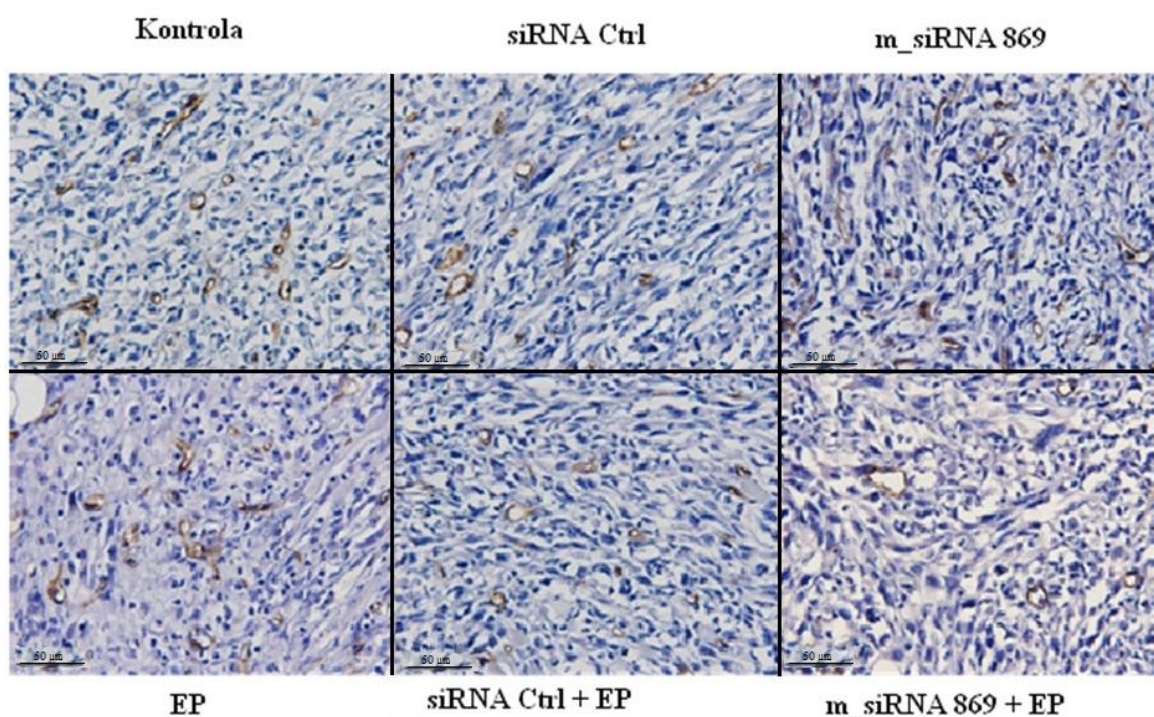


Slika 25: Rast tumorja izpostavljenega 3-kratni terapiji (puščice nakazujejo dan terapije), * $P < 0,05$ proti vsem skupinam.

Figure 25: Growth of TS/A tumors exposed to repetitive therapies (arrows represent the days of treatment), * $P < 0,05$ vs. all groups.

4.3.2 Ovrednotenje učinka elektrotransferja m_siRNA v mišje tumorje z merjenjem gostote tumorskega žilja

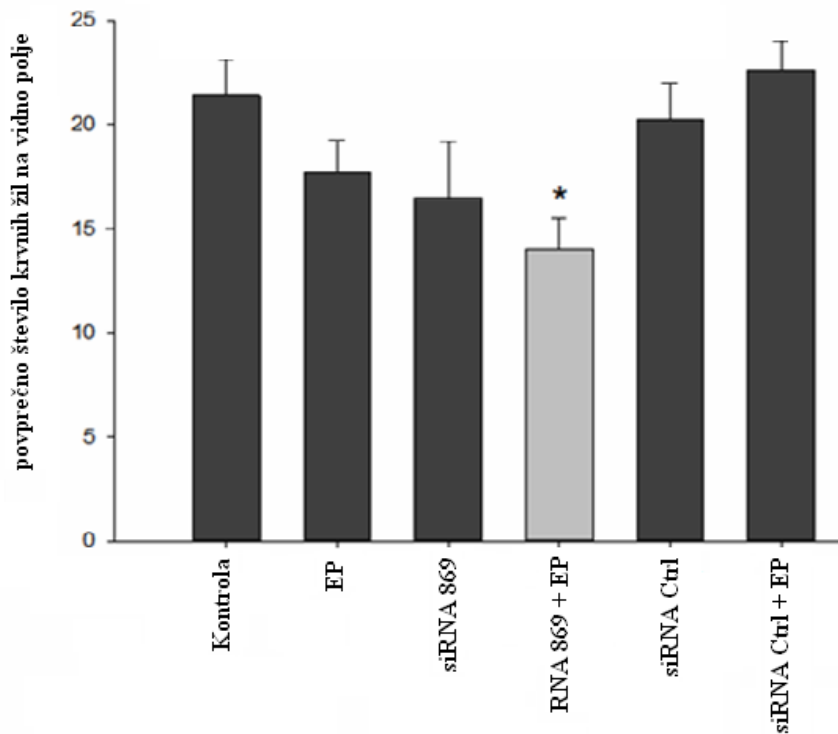
V viabilnem delu tumorja nismo opazili morfoloških sprememb endotelijskih celic ali debelosti krvnih žil pri različnih skupinah. Pri skupini s ponavljajočim elektrotransferjem m_siRNA 869 smo opazili žile z večjim volumnom. Hkrati tu male krvne žile niso bile izrazite do take mere kot pri ostalih skupinah. Endoglin sodeluje pri aktivaciji endotelijskih celic, torej rasti krvnih žil. Zaradi tega smo za določevanje antiangiogenega učinka utišanja endoglina upoštevali le CD31-pozitivne krvne žile manjše od 30 μm , kar je predstavljalo mejno točko reprezentativno za kapilare (Sl. 26).



Slika 26: IHC pobarvani preparati TS/A tumorskega tkiva proti CD31 pri različnih terapevtskih skupinah; le H₂O sama (kontrola) ali z električnimi pulzi (EP), intratumorsko injiciranje m_siRNA 869 ali negativne kontrolne siRNA (siRNA Ctrl), elektrotransfer m_siRNA 869 (m_siRNA 869 + EP) in negativne kontrolne siRNA (siRNA Ctrl + EP).

Figure 26: IHC stained sections against CD31 of TS/A tumour tissue in different therapeutic groups; H₂O alone (control) or combined with application of electric pulses (EP), intratumoral injection of m_siRNA 869, intratumoral injection of negative control siRNA (siRNA Ctrl), electrotransfer of m_siRNA 869 (m_siRNA 869 + EP) and negative control siRNA (siRNA Ctrl + EP).

Elektrotransfer m_siRNA je občutno zmanjšal število krvnih žil v tumorju. Le aplikacija električnih pulzov ali le golo injiciranje m_siRNA sta sicer tudi zmanjšala število krvnih žil, a ne v takem obsegu. Terapija, pri kateri smo uporabili kontrolno siRNA Ctrl samo ali v kombinaciji z EP, ni vplivala na število krvnih žil (Sl. 27).



Slika 27: Povprečno število krvnih žil v vidnem polju pri 60-kratni povečavi, * $P < 0,05$ proti kontroli, siRNA Ctrl ter siRNA Ctrl + EP. (EP-elektroporacija, Ctrl-kontrola).

Figure 27: Average number of blood vessels per field of view in tumor sections at 60x magnification, * $P < 0,05$ vs control, siRNA Ctrl and siRNA Ctrl + EP. (EP-electroporation, Ctrl-control).

5 RAZPRAVA

V literaturi je opisanih več metod za ugotavljanje prisotnosti krvnih žil (Pusztaszeri in sod, 2006; Hvingel in sod, 2012). Največkrat se uporabljajo različna monoklonska protitelesa, ki se specifično vežejo na krvne žile, a se tu lahko pojavijo težave zaradi poškodb ali zakritja antigenov med pripravo tkiva. Na tak način je vezava protiteles onemogočena in posledično so rezultati neprimerni. Kljub kopici protiteles na tržišču je težko najti taka, ki so specifična predvsem za krvne žile. Tumorske endotelijske celice zadržijo izražanje molekule CD31, ki se nahaja v medceličnih povezavah med endotelijskimi celicami in na nekaterih krvnih celicah. Zaradi tega smo se odločili, da bomo za označevanje krvnih žil uporabili protitelesa, ki se na to molekulo vežejo, ter označevalce za lažjo detekcijo (Wang in sod., 2008; Dallas in sod., 2008). Uporabili smo protitelesa proti CD31 različnih proizvajalcev (Serotec, BD PharmigenTM, Abcam) in poskusili sestaviti imunski kompleks s pomočjo kompletov (DAKO, Abcam). Želeli smo, da se na mišje endotelijske tumorske celice vežejo podganja primarna protitelesa proti mišjim CD31, nanje pa biotinizirani, poliklonski zajčji imunoglobulini proti podganjim primarnim protitelesom. Na te smo vezali še kompleks streptavidin-HRP (hrenova peroksidaza), ki ima za svoj substrat DAB. DAB pufer in kromogen sta bila dodana na koncu. Mešanica DAB in vodikovega peroksida sproži ob prisotnosti HRP oksidacijo DAB, kjer tri radikalski intermediati ob polimerizaciji tvorijo rjav produkt (Ramos-Vara, 2005). Če so bili reagenti delujoči in je reakcija potekla, smo na brisački, na katero smo jih odlivali, opazili rjavo reakcijo. Čeprav smo pozitivno reakcijo na brisački dobili pri vseh protitelesih in kompletih (DAKO in Abcam), s samimi preparati ni bilo tako. Ob uporabi primarnih protiteles proizvajalca Serotec ni nikjer prišlo do pozitivne reakcije na žilah. Te so ostale nepobarvane neglede na uporabljene redčitve protiteles ali reagente. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da se primarna protitelesa niso vezala na CD31. Druga možnost pa je, da s pripravo preparata nismo izpostavili antigenov. Ob uporabi produktov BD PharmigenTM smo za razliko od prej dobili pozitivno reakcijo le na nekaterih tumorskih celicah, ne pa na krvnih žilah, torej nespecifično reakcijo. Razloga za tak rezultat sta ali nevezanje primarnega protitelesa na CD31 ali pa neustrezno izpostavljanje antigena. Edina protitelesa in komplet reagentov, ki sta bila uspešna za barvanja endotelijskih tumorskih celic žil, sta proizvoda Abcam. Vse žile so bile tu opazne že pri redčitvi 1 : 100. Poskusili smo tudi različno dolge inkubacije preparatov s primarnimi protitelesi (preko noči na 4°C ter 2 uri pri sobni temperaturi) in različno dolge čase izpostavljanja antigenov (toplotna obdelava v mikrovalovni pečici 5-krat po 5 min (pri jakosti 800 W) ali 40 min namakanje v ohlajajočem se pufru). Na podlagi dobljenih rezultatov smo prišli do optimizacije imunohistokemičnega protokola.

Optimiziran IHC-protokol barvanja proti CD31 smo uporabili na vzorcih TS/A tumorjev različnih terapevtskih skupin (le H₂O sama (kontrola) ali z električnimi pulzi (EP), intratumorsko injiciranje m_siRNA 869 ali negativne kontrolne siRNA (siRNA Ctrl),

elektrotransfer m_siRNA 869 (m_siRNA 869 + EP) in negativne kontrolne siRNA (siRNA Ctrl + EP)) in na tak način določali antiangiogen učinek navedene terapije.

Pri antiangiogeni, kronični terapiji se preprečuje nastajanje novih žil pri črvstih tumorjih (Nassiri in sod., 2011) z inhibicijo delitve endotelijskih celic in sproščanja proangiogenih faktorjev. Terapija ni samostojen način zdravljenja raka, pač se uporablja kot dodatek h klasičnim zdravljenjem. Posledica terapije je opazna kot zaostanek v rasti tumorja. Večina antiangiogenih terapij temelji na uporabi specifičnih monoklonskih protiteles, ki se vežejo na endotelijske faktorje ali njihove receptorje, in malih molekulah, ki inhibirajo znotrajcelične tirozin-kinazne poti (Serša in sod., 2008). Do sedaj se v kliniki za ta način terapije že uporabljajo nevtralizacijskega protitelesa VEGF (npr. bevacizumab) in blokatorji signalnih poti, kot je signalna pot VEGF (npr. sorafenib) (Carmeliet in Jain, 2011), a je z njimi potrebna previdnost zaradi hudih stranskih učinkov, kot sta okvara ledvic in možganska hemoragija (Yamamoto in sod., 2001).

Genska terapija, kot novejša metoda zdravljenja raka, temelji na vnosu učinkovitega terapevtskega gena v tarčno tkivo. Zaradi tega se je porodila zamisel, da bi to terapijo združili z antiangiogenim pristopom in tako učinkoviteje vplivali na samo zdravljenje.

Predhodne klinične raziskave so z uporabo monoklonskih protiteles (Düwel in sod., 2007) pokazale, da je transmembranski glikoprotein, endoglin (CD105) primeren kandidat za tovrstno terapijo. Povišana ekspresija endoglina je zaznana pri aktivnih in proliferacijskih tumorskih endotelijskih celicah žil (Nassiri in sod., 2011), medtem ko je v normalnih razmerah stopnja izražanja zelo nizka (Dallas in sod., 2008).

Na podlagi raziskav smo se odločili, da bomo izvedli gensko terapijo z molekulami siRNA proti CD105, saj ta še ni bila opisana v literaturi. Glede na objavljene raziskave je tako naša raziskava prvi primer izvedbe in ovrednotenja protitumorskega delovanja na podlagi utišanja endoglina na mišjem tumorskem modelu *in vivo*.

Med terapijo se teža živali ni spreminjala, kar kaže na odsotnost stranskih učinkov.

Tumorji zdravljeni s 3-kratno elektrogensko terapijo so rastle počasneje kot pri ostalih skupinah. Njihova velikost je bila statistično značilno manjša že prvi dan po prvi terapiji, kar je razvidno iz rastle krivulje (Sl. 25). Počasnejša rast tumorja, vendar v manjšem obsegu kor pri skupini, zdravljeni z elektrogensko terapijo, je bila opažena tudi pri skupini, kjer smo injicirali le terapevtsko m_siRNA 869, kar kaže na to, da molekule siRNA v določeni meri lahko vstopajo v celice. Razlika med skupinami je bila statistično značilna le v času izvajanja terapije, saj se je rast tumorjev kmalu po zaključku terapije nadaljevala z enako hitrostjo kot rast nezdravljenih tumorjev. Iz tega lahko sklepamo, da ima uporabljena molekula siRNA zmožnost zaviranja rasti tumorskega žilja, a sta njen učinek in življenjska doba kratka. V nadaljnjih raziskavah bi lahko poskusili najti način, kako zaščititi molekule siRNA pred prehitro razgradnjo in na tak način povečati njeno učinkovitost (Zhang in sod., 2012). V primerjavi z ostalimi terapijami z monoklonskimi protitelesi, ki ciljajo endoglin, je elektrogensko terapija enako uspešna. Rast tumorjev po

sistemski 5-kratni terapiji z monoklonskimi protitelesi je bila enako zavrta kot po lokalni 3-kratni elektrogenski terapiji (Tsuje in sod., 2006). Z našim terapevtskim pristopom smo torej dokazali, da je tovrstna terapija izvedljiva, brez stranskih pojavov in bi torej naš pristop lahko služil kot alternativna terapija pri zdravljenju s protitelesi.

S pomočjo IHC barvanja in računalniške obdelave slik smo ugotavljali število krvnih žil v tkivnih rezinah tumorjev. Zmanjšanje števila krvnih žil je bilo v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno pri zdravljeni (m_siRNA 869 + EP) skupini, medtem ko je bila gostota žilja manjša tudi pri skupinah z le EP ter golim injiciranjem m_siRNA 869, a ne v takem obsegu. Terapija, pri kateri smo uporabili kontrolno siRNA Ctrl samo ali v kombinaciji z EP, ni vplivala na zmanjšanje števila krvnih žil. IHC barvanje nam je potrdilo, da je terapija z elektrotransferjem m_siRNA učinkovita, saj je gostota tumorskega žilja bistveno manjša kot pri ostalih skupinah.

Povzamemo lahko, da smo uspešno razvili IHC-protokol, s katerim lahko ovrednotimo učinke antiangiogene terapije na podlagi gostote tumorskega žilja. Metoda barvanja je primerna za barvanje tumorskih in normalnih žil. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je elektrotransfer molekul siRNA proti endoglinu učinkovit način terapije *in vivo*, saj smo dokazali zmanjšanje rasti tumorja in zmanjšano gostoto tumorskih žil v zdravljenih tumorjih. Glede na to, da so molekule siRNA ohranile terapevtsko delovanje le kratek čas, bi morali odkriti še ustrezne postopke za podaljševanje njene dolgoživosti. Živali ob terapiji niso kazale na prisotnost stranskih učinkov, zato je smiselno tovrstno terapijo razvijati tudi v prihodnosti.

6 SKLEP

V okviru magistrskega dela smo testirali protitelesa različnih proizvajalcev proti antigenu CD31 za označevanje krvnih žil v mišjih tumorjih. Najbolje se je obneslo barvanje s primarnimi protitelesi proizvajalca Abcam ter njihovim kompletom sekundarnih in terciarnih protiteles. Na podlagi tega smo pripravili IHC-protokol, s katerim smo dobili pozitivno reakcijo na vseh krvnih žilah v tumorju.

S pomočjo razvitega protokola in z ugotavljanjem gostote tumorskega žilja smo nadalje želeli ovrednotiti učinek genske terapije z m_siRNA 869 proti CD105 na tumorjih TS/A. Ugotovili smo, da je poleg zmanjšane rasti tumorja opazna še manjša gostota njegovih žil. Zatorej bi lahko utišanje izražanja endoglina imelo protitumorsko učinkovitost *in vivo*, a so potrebne nadaljnje preiskave.

7 POVZETEK

7.1 POVZETEK

Rak je ime za skupek različnih bolezni, za katere je značilna nekontrolirana rast celic. Dejavnike, ki vplivajo na nastanek raka, delimo v dve večji skupini; eksogene in endogene. Eksogenim pripisujemo življenjski slog, prehrano ter okoljske vplive, endogenim pa napake pri popravilu poškodb DNA, metabolizmu, hormonih in pri dednih napakah. Karcinogeneza ali razvoj raka je proces, ki ga delimo na iniciacijo, promocijo, progresijo in metastaziranje. Začetnim spremembah na DNA sledi faza promocije, pri kateri se spremenjene celice delijo in izražajo nove lastnosti. Če razni inhibitorji ob tem niso uspešni, se aktivirajo faktorji dediferenciacije in angiogeneze. Posledici sta heterogenost in rast tumorja. Ko tumor preseže določeno velikost, se v centralnem delu pojavijo hipoksija, nizek pH ter pomanjkanje hranil, kar sproži angiogenezo. Če je tumor ožiljen, se lahko rakave celice odcepijo od gmote in po organizmu tvorijo metastaze, kar predstavlja zadnjo stopnjo karcinogeneze. Tumorsko žilje nastaja z brstenjem in nepravilnim vraščanjem večjega števila žil. Za omejitev rasti tumorja, njegov propad in preprečitev nastanka metastaz je tako bistveno uničevanje žilja, ki se danes v onkologiji pojavlja kot t. i. antiangiogena terapija. Je stalna, kronična terapija, ki zavira delitve endotelijskih celic in sproščanje proangiogenih faktorjev, kar se odraža na zaostanku rasti tumorja. Zaenkrat se uporabljajo monoklonska protitelesa, ki se vežejo na endotelijske faktorje ali njihove receptorje, ter male molekule pomembne za inhibicijo znotrajcelične tirozin-kinazne poti. Nove potencialne tarče se razvijajo z gensko terapijo in ena izmed teh je endoglin (CD105). Izražanje endoglina je močno povečano v endotelijskih celicah žil tumorja ali teh, ki ga obdajajo. Njegova vloga je aktivacija kompleksne signalne poti TGF- β , povezane s proliferacijo, migracijo in adhezijo endotelijskih celic. S pomočjo monoklonskih protiteles proti endoglinu so pokazali, da je endoglin primeren kandidat za antiangiogeno terapijo, a sama genska terapija z molekulami siRNA proti endoglinu še ni bila opisana v literaturi. Interferenca RNA, kamor sodi tudi siRNA, je evolucijsko star obrambni mehanizem, ki ščiti organizem pred eksogenimi in endogenimi nukleinskimi kislinami ter posttranskripcijsko uravnava izražanje genov.

Pri naši terapiji smo želeli preveriti delovanje molekule siRNA proti mišjemu endoglinu in učinek te terapije z merjenjem velikosti tumorja. Najprej smo mišim BALB/C podkožno injicirali suspenzijo celic TS/A in počakali, da zraste do velikosti 3 mm³. Živali so bile razdeljene v 6 skupin; kontrola, skupine le z EP, siRNA 869 ali siRNA Ctrl, ter še v skupini, ki sta poleg določene siRNA prejeli še EP (siRNA Ctrl + EP ali siRNA 869 + EP (terapevtska skupina)). Glede na to, da so molekule siRNA kratkožive, smo EP izvajali takoj po injiciranju molekul siRNA v tumor. Terapijo smo izvajali 3 dni zaporedoma in še 2 dni po tem spremljali velikost tumorja in težo živali, da bi lahko opazili morebitne stranske učinke. Iz vsake eksperimentalne skupine smo po 2 dneh od končane terapije žrtvovali 2–3 živali in odvzeli tumorje za nadaljnjo histološko analizo.

Z določevanjem učinka terapije na tumorsko žilje je mogoče ugotavljati protitumorski učinek antiangiogenih terapij pri čvrstih tumorjih. Ena od metod za tako ugotavljanje temelji na opazovanju gostote tumorskega žilja s pomočjo imunohistokemičnega označevanja endotelijskih celic tumorskih krvnih žil. Bistveno pri taki metodi je, da dobimo pozitivno reakcijo na res vseh prisotnih žilah. Pri pripravi je ključno, da ostanejo med njo antigeni nepoškodovani in izpostavljeni, saj tako omogočajo vezanje protiteles. Klasična priprava tkivnih parafinskih vzorcev temelji na predhodni fiksaciji tkiva, pri kateri smo uporabili cinkov fiksativ, ki manj poškoduje prisotne proteine. Največkrat se za označevanje krvnih žil uporablja protitelesa proti CD31, ki je trombocitna endotelijska adhezijska molekula. Nahaja se v medceličnih povezavah med endotelijskimi celicami in na nekaterih krvnih celicah. Tumorske endotelijske celice zadržijo izražanje CD31, zato je to zelo primeren antigen za označevanje tumorskih žil. Testirali smo protitelesa različnih proizvajalcev (Abd Serotec, BD PharmigenTM, Abcam), različne dobe inkubacij ter različne komplete reagentov. Preparat smo kontrastirali s hematoksilinom, da smo celice pod mikroskopom lažje ločevali. Pri vseh imunohistokemičnih barvanjih smo uporabljali ustrezne pozitivne in negativne kontrole. Preparat obarvane IHC smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom BX-51, na katerega je bila priključena digitalna kamera DP72. Slikali smo 6 naključno razporejenih predelov tumorja v viabilnem delu tumorja, pridobljene slike pa smo analizirali s programom AxioVision. Po nekaj korakih smo dobljeni natančni obrisi spremenili v binarno sliko (masko krvnih žil), na kateri smo določili število krvnih žil in njihove premere. V nadaljnji analizi smo upoštevali samo krvne žile s premerom, manjšim od 30 μm . Za vse podatke smo preverili normalno distribucijo s pomočjo Shapiro-Wilkovega testa, razlike med eksperimentalnimi skupinami pa smo statistično ocenili z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA) ter Holm-Sidakovim testom za množično primerjavo. Statistično pomembni so bili rezultati s P-vrednostmi pod 0,05. Za statistično analizo in grafične prikaze smo uporabili SigmaPlot Software.

Primarna protitelesa različnih proizvajalcev in kompleti so se različno obnesli. Primarna protitelesa proizvajalca Abd Serotec se niso izkazala za uspešna, saj se krvne žile niso obarvale ne v tumorju TS/A in ne v mišjem srcu, kot kontroli. Pravtako, pozitivne reakcije nismo zasledili ob uporabi BD PharmigenTM primarnih protiteles. Edina uspešna primarna protitelesa so bila proizvod proizvajalca Abcam in so specifično barvanje dosegla že pri redčitvi 1 : 100. Izpostavljanje antigenov v ohlajajočem se pufru se je izkazalo za manj uspešno od standardne toplotne obdelave preparatov v mikrovalovni pečici, saj se pri prvem postopku niso pobarvale vse žile. Najbolje se ni obnesla niti 2-urna inkubacija primarnih protiteles pri sobni temperaturi, saj so tudi pri redčitvi 1 : 50 nekatere žile ostale nepobarvane. Pri pozitivni kontroli so se krvne žile obarvale rjavo in se tako lepo ločijo od okoliškega tkiva. Pri negativni kontroli nismo opazili obarvanja žil ali okoliškega tkiva.

Velikost tumorjev se je med skupinami razlikovala. Tumorji, zdravljeni s 3-kratno elektrogensko terapijo, so rastle počasneje kot v ostalih skupinah. Velikost tumorjev je bila

statistično značilno manjša že prvi dan po prvi terapiji, a se je rast tumorjev po zaključku terapije nadaljevala z enako hitrostjo kot pri tumorjih v kontrolni skupini. Iz dobljene rastne krivulje tumorjev je razvidno, da je terapevtski učinek molekul siRNA proti endoglinu kratkotrajen.

Z merjenjem gostote tumorskega žilja smo ovrednotili učinek elektrotransferja m_siRNA v mišje tumorje. Pri skupini, kjer smo injicirali m_siRNA 869 in uporabili EP smo opazili žile z večjim volumnom, hkrati pa male krvne žile niso bile izrazite do take mere kot pri ostalih skupinah. Glede na to, da endoglin sodeluje pri tvorbi novih žil, smo za določanje antiangiogenega učinka utišanja endoglina upoštevali le pozitivne krvne žile CD31 manjše od 30 μm , kar je predstavljalo mejno točko, reprezentativno za kapilare.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je ta vrsta terapije *in vivo* delovala na zmanjšanje rasti tumorja ter na redukcijo njegovega žilja.

Nespremenjena teža živali med terapijo kaže na odsotnost stranskih učinkov, zato bi naš pristop lahko služil kot alternativna terapija zdravljenju s protitelesi. Ciljanje endoglina bi lahko postalo alternativa terapijam anti-VEGF, saj so med terapijami s slednjimi zasledili razne stranske učinke, kot sta okvara ledvic in možganske krvavitve.

7.2 SUMMARY

Cancer is a common name for many different kinds of diseases that are represented by uncontrolled cell growth. Factors, which induce carcinogenesis, are divided into two groups; exogenous and endogenous. Lifestyle, diet and environmental substances are exogenous factors, while damaged DNA repair function, metabolism or hormones errors and genetic defects are endogenous factors. Carcinogenesis is a process divided in initiation, promotion, progression and metastasis. After DNA mutation, cells begin to divide. When inhibitors are not successful, factors for dedifferentiation and angiogenesis are promoted. Tumor begins to grow until it reaches certain volume (3mm^3). Above that size hypoxia, low pH and lack of nutrients appears. At that point, tumor needs blood vessels for supplying oxygen and nutrients, therefore angiogenesis is promoted and vessels from tumor surrounding begin to sprout into the tumor. If tumor has blood vessels, cancer cells can leave original spot and migrate all over the body, creating metastases. Tumor blood vessels have unorganized growth and can be easily distinguished from normal blood vessels. Anti-angiogenic therapy, as one of clinical therapies, disrupts formation of tumor blood vessels by inhibiting growth of endothelial cells and releasing of pro-angiogenic factors. Consequently tumor growth, spreading and forming of metastases are reduced. In the clinical setting, monoclonal antibodies, that bind to endothelial factors or their receptors, and small molecules important for inhibiting intracellular tyrosin-kinase pathway, are currently used. By using gene therapy, new potential targets are developed. One of them is endoglin (CD105) molecule, found on endothelial cells of tumor and its surrounding. Its role is activation of TGF- β signaling pathway that activates proliferation, migration and adhesion of endothelial cells. Monoclonal antibodies against endoglin have shown that endoglin is an appropriate target for anti-angiogenic therapy. Gene therapy with siRNA molecules against endoglin has not yet been described. RNA interference, which includes siRNA, is an evolutionary old defensive mechanism that protects organisms from exogenous and endogenous nucleic acids and regulates gene transcription.

The aim of our study was to evaluate the therapeutic potential of siRNA molecules against mouse endoglin *in vivo* by measuring tumor growth and determination of tumor blood vessels density.

For induction of subcutaneous tumors, a suspension of TS/A cells was injected into the right flank of mice. When tumors reached the volume of 3mm^3 animals were randomly divided into 6 experimental groups (control, EP, siRNA 869, siRNA Ctrl, siRNA 869 + EP and siRNA Ctrl + EP). Tumors were treated with intratumoral injection m_siRNA 869 and immediately thereafter electric pulses were applied. Therapy was performed 3 days consecutively and animals were observed for additional 2 days. From each experimental group, 2-3 mice were sacrificed at day 2 post-treatment and tumors were excised for histology analyses.

Anti-tumoral effect of anti-angiogenic analyses can be determined by evaluating therapy effect on tumor blood vessels. One of methods is detecting and counting blood vessels

after endothelial tumor cells IHC staining, where all the vessels must be positive. Along tissue preparation antigens have to be undamaged and unmasked. For tissue fixation without damaging proteins, Zinc fixative was used. For detecting blood vessels are commonly used primary antibodies anti CD31. CD31 is platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), also found on endothelial and blood cells of tumor, what makes it appropriate antigen for detecting tumors blood vessels. Antibodies of different producers (Abd Serotec, BD PharmigenTM, Abcam) were tested. Hematoxylin was used for contrasting sections. Positive and negative controls were used with all corresponding IHC staining. IHC sections were observed under light microscope BX-51 connected to a digital camera DP72. For each section, 6 randomly chosen images were taken of viable part of tumor and obtained images were analyzed by AxioVision software. After a few steps, original image was converted into a binary image, here the number of blood vessels and their diameters were determined. In addition only the blood vessels with diameters smaller than 30 μm were analyzed. All data were tested for normality of distribution with the Shapiro-Wilk test. The differences between the experimental groups were statistically evaluated by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by a Holm-Sidak test for multiple comparison. A P-value of less than 0,05 was considered to be statistically significant. SigmaPlot Software was used for statistical analysis and graphical representation.

Primary antibodies and kits from different manufacturers resulted in different CD31 antigen staining. Primary antibody from manufacturer Abd Serotec (anti CD31) was not effective, because none of the blood vessels were stained in TS/A tumors, heart or controls. Primary antibody obtained from BD PharmigenTM did not provide positive reaction in any part of the tumor or controls. The only successful and specific primary antibody and kit were by Abcam. Sections were specifically stained at the antibody dilution of 1 : 100. Antigen unmasking in cooling buffer has proved to be less successful than regular demasking by cooking in the microwave, because not all of the vessels were stained. 2h incubation of primary antibody at room temperature instead overnight incubation at 4°C also did not provide optimal results. The positive control sections had blood vessels stained brown and nicely separated from the surrounding tissue. For negative control sections, we did not observe staining of blood vessels or surrounding tissues in brown.

Measurement of tumor growth demonstrated that the growth of tumors treated with triple electrotransfer of m_siRNA 869 in 3 consecutive days was reduced compared to the growth of tumors in other groups. The size of the treated tumors was statistically significantly reduced on the first days of treatment, but after the end of treatment tumors continued to grow at the same rate as tumors in the control group. Tumor growth curve shows that the therapeutic effect of siRNA molecules against endoglin is short-lasting.

By measuring the density of tumor vasculature, we evaluated the effect of triple electrotransfer of m_siRNA in murine tumors. In a group where we injected m_siRNA 869 combined with EP, vessels of larger volume and fewer number of small blood vessels were

observed compared to other groups. As endoglin participates in the formation of new blood vessels (capillaries), we have analyzed only CD31 positive blood vessels of less than 30 μ m in diameter in order to determinate anti-angiogenesis potential of silencing of endoglin.

From the results we can conclude that this type of therapy contributed to slower tumor growth and to reduction of its vasculature.

No observed changes in animal weight during treatment indicate a lack of side effects. Targeting endoglin could thus become an alternative to anti-VEGF therapies, which have different side effects such as kidney failure and cerebral hemorrhage.

8 VIRI

- Albini A., Benelli R., Noonan D.M., Brigati C. 2004. The “chemoinvasion assay”: a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *International Journal of Developmental Biology*, 48: 563–571
- Ariano P., Distasi C., Gilardino A., Zamburlin P., Ferraro M. 2005. A simple method to study cellular migration. *Journal of Neuroscience Methods* 141: 271–276
- Aronin N. 2006. Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Therapy*, 13, 6: 509–16
- Auerbach R., Auerbach W., Polakowski I. 1991. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacology & Therapeutics*, 51: 1–11
- Auerbach R., Akhtar N., Lewis R.L., Shinnars B.L. 2000. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer and Metastasis Reviews*, 19: 167–172
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., Akhtar N. 2003. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical Chemistry*, 49: 32–40
- Bernhardt, J. in Pauly, H. 1973. On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik*, 10, 3: 89–98
- Boyden S. 1962. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 115: 453–466
- Bradmanje Ž., Kostović-Knežević L. 2005. *Osnove histologije: udžbenik i atlas*. 10. izd. Zagreb, Šoklska knjiga: 510 str.:1–2
- Cai G., Lian J., Shapiro S.S., Beacham D.A. 2000. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. *Methods in Cell Science*, 22: 107–114
- Carmeliet P., Jain K. R. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407: 249–257
- Carmeliet P., Jain K. R. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347): 298–307
- Chung S. A., Lee J., Ferrara N. 2010. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 10: 505–514
- Connolly J.O., Simpson N., Hewlett L., Hall A. 2002. Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 13: 2474–2485
- Costello B., Li C., Duff S., Butterworth D., Khan A., Perkins M., Owens S., Al-Mowallad A. F., O'Dwyer S., Kumar S. 2004. Perfusion of ⁹⁹Tcm-labeled CD105 Mab into

- kidneys from patients with renal carcinoma suggests that CD105 is a promising vascular target. *International Journal of Cancer*, 109, 3: 436–41
- Čemažar, M. 2005. *Tumor Biology. Electroporation based Technologies and Treatments: proceedings of the international scientific workshop and postgraduate course*, Ljubljana 2005, Kramar P., Miklavčič D., Faculty of Electrical Engineering: 71–75
- Čemažar M. 2009 *Tumor Biology. Proceedings of the Electroporation based Technologies and Treatments: International scientific workshop and postgraduate course*, Ljubljana 2009, Kramar P., Miklavčič D., Mir L. M. 1. izd., Ljubljana: FE in FRI, 2009, str. 70–71
- Čemažar, M. in Serša, G. 2007. Electrotransfer of therapeutic molecules into tissues. *Current opinion in molecular therapeutics*; 9, 6: 554–562
- Čemažar, M., Serša, G., Wilson, J., Tozer, G. M., Hart, S. L., Grošel, A., Dachs, G. U. 2002. Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Therapy*; 9, 4: 399–406
- Čemažar, M., Golzio, M., Serša, G., Rols, M. P., Teissie, J. 2006. Electrically-assisted nucleic acids delivery to tissues in vivo: where do we stand? *Current Pharmaceutical Design*; 12, 29: 3817–3825
- Dallas N.A., Samuel S., Xia L., Fan F., Gray M.J., Lim S.J., Ellis L.M. 2008. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clinical cancer research*, 14, 7: 1931–1037
- Debeir O., Camby I., Kiss R., Van Ham P., Decaestecker C. 2004. A model-based approach for automated in vitro cell tracking and chemotaxis analyses. *Cytometry*, 60: 29–40
- Dellian M., Witwer B.P., Salehi H.A., Yuan F., Jain R.K. 1996. Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *The American Journal of Pathology*, 149: 59–72
- de Matos L. L., Trufelli D.C., de Matos L. M. G., da Silva P. M .A. 2010. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomarker Insights*, 5: 9–20
- Donovan D., Brown N.J., Bishop E.T., Lewis C.E. 2001. Comparison of three in vitro human ‘angiogenesis’ assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis*, 4: 113–121

- Duff S.E., Li C., Garland J.M., Kumar S. 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB Journal*, 17, 9: 984–992
- Düwel A., Eleno N., Jerkic M., Arevalo M., Bolaños J.P., Bernabeu C., López-Novoa J.M. 2007. Reduced tumor growth and angiogenesis in endoglin-haploinsufficient mice. *Tumor biology*, 28, 1: 1–8
- Folkman J. 2007. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 4: 273–286
- Friis T., Kjaer Sorensen B., Engel A.M., Rygaard J., Houen G. 2003. A quantitative ELISA-based co-culture angiogenesis and cell proliferation assay. *APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)*, 111: 658–668
- Fujita K., Ewing C. M., Chan D. Y., Mangold L. A., Partin A.W., Isaacs W. B., Pavlovich C. P. 2009. Endoglin (cd105) as a urinary and serum marker of prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 124, 3: 664–669
- Gagnon E., Cattaruzzi P., Griffith M. 2002. Human vascular endothelial cells with extended life spans: in vitro cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis*, 5: 21–33
- Gehl J. 2003. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177, 437–447
- Gerlowski E. L., Jain K. R. 1986. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvascular Research*, 31, 3: 288–305
- Gomez D., Reich N.C. 2003. Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *Journal of Immunology*, 170: 5373–5381
- Goukassian D., Diez-Juan A., Asahara T. 2001. Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *The FASEB Journal*, 15: 1877–1885
- Hanahan D. in Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 1: 57–70
- Hanahan D. in Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 5: 646–674
- Hannon J. G. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 7: 244–251
- Hulka S. B., Moorman P. G. 2008. Reprint of breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*, 61, 1–2: 203–213

- Hvingel B., Lieng M., Roald B., Ørbo A. 2012. Vascular markers CD31, CD34, actin, VEGFB, and VEGFR2, are prognostic markers for malignant development in benign endometrial polyps. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2: 18–26
- Jain R.K., Schlenger K., Hoeckel M., Yuan F. 1997. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nature Medicine*, 3: 1203–1208
- Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global cancer statistics. *A Cancer Journal of Clinicians*, 61: 69–90
- Jordan C. T., Guzman L. M., Noble M. 2006. Mechanisms of disease: Cancer stem cells. *The New England Journal of Medicine*, 355: 1253–1261
- Kesmodel, S. B. in Spitz, F. R. 2003. Gene therapy for cancer and metastatic disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5, 17: 1–18
- Korn T., Müller R., Kontermann R. E. 2004. Bispecific Single-Chain Diabody-Mediated Killing of Endoglin-Positive Endothelial Cells by Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*, 27, 2: 99–106
- Kotnik, T., Macek-Lebar, A., Kanduser, M., Pucihar, G., Pavlin, M., Valic, B., Miklavčič, D. 2005. Elektroporacija celiene membrane: teorija ter poizkusi *in vitro*. *Medicinski razgledi*, 44, 81–90
- Laschke M.W., Elitzsch A., Vollmar B., Vajkoczy P., Menger M.D. 2006. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Human Reproduction*, 21: 262–268
- Li C., Guo B., Wilson P.B., Stewart A., Byrne G., Bundred N., Kumar S. 2000. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, 89, 2: 122–126
- Lui T-C., Kirn D. 2008. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Nature. Gene Therapy* , 15: 877–884
- Mansel E. R., Fodstad O., Jiang G. W. 2008. *Metastasis of breast cancer*. Dordrecht, Nizozemska, Springer: 120
- Matsuno F., Haruta Y., Kondo M., Tsai H., Barcos M., Seon K. B. 1999. Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clinical Cancer Research*, 5, 2: 371–382

- Menger M.D., Laschke M.W., Vollmar B. 2002. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *European Surgical Research*, 34: 83–91
- Michelson D. A. 2007. *Platelets*. 2nd ed. London, Velika Britanija, Elsevier Inc.: 336
- Montesano R., Pepper M.S., Orci L. 1993. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 105: 1013–1024
- Nassiri F., Cusimano D. M., Scheithauer W. B., Rotondo F., Fazio A., Yousef M. G., Syro V. L., Kovacs K., Lloyd V. R. 2011. Endoglin (CD105): A Review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer research*. 31: 2283-2290
- Neckers L.M., Funkhouser W.K., Trepel J.B., Cossman J., Gratzner H.G. 1995. Significant non-s-phase DNA synthesis visualised by flow cytometry in activated and in malignant human lymphoid cells. *Experimental Cell Research*, 156: 429–438
- Neumann E. in Rosenheck K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology*, 10, 3: 279–290
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1, 7: 841–845
- Novakovič S. in sod. (53 avtorjev). 2009. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. V: Molekularni mehanizmi nastanka raka-karcinogeneza*. Novakovič S. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 24–35
- Novakovič S. in sod. (53 avtorjev). 2009. *Onkologija: raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka. V: Radioterapija*. Strojman P., Casar B., Petrič P. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Mladinska knjiga: 120–155
- Pai S. I., Lin Y. Y., Macaes B., Meneshian A., Hung C. F., Wu T. C. 2006. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Therapy*, 13, 6: 464–477
- Palmer, D. H., Young, L. S., Mautner, V. 2006. Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends in Biotechnology*, 24, 2: 76–82
- Pepper M.S., Belin D., Montesano R., Orci L., Vassalli J.D. 1990. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 111: 743–755

- Pusztaszeri P. M., Seelentag W., Bosman T. F. 2006. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54, 4: 385–395
- Rak v Sloveniji 2008. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2011
- Ramon A-L., Bertrand J-R., Malvy C. 2008. Delivery of small interfering RNA. A review and an example of application to a junction oncogene. *Tumori*, 94: 254–263
- Ramos-Vara J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42: 405–426
- Ross H. M., Pawlina W. 2006. *Histology. A text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5th ed. Philadelphia, ZDA, Lippincott Williams and Wilkins: 1–2
- Sanz L., Pascual M., Munoz A., Gonzalez M.A., Salvador C.H., Alvarez-Vallina L. 2002. Development of a computerassisted high-throughput screening platform for anti-angiogenic testing. *Microvascular Research*, 63: 335–339
- Serša G., Čemažar M., Snoj M. 2008. Elektrokemoterapija: učinki na žilje tumorja. *Onkologija*, leto XII, 2: 132–134
- Shan S., Lockhart A.C., Saito W.Y., Knapp A.M., Laderoute K.R., Dewhirst M.W. 2001. The novel tubulin-binding drug bto-956 inhibits r3230ac mammary carcinoma growth and angiogenesis in fischer 344 rats. *Clinical Cancer Research*, 7: 2590–2596
- Shan S., Dewhirst M.W. 2006. Corneal angiogenesis assay. V: *Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques*. Staton C. A., Bicknell R., Lewis C. E. (eds.). Chichester, UK: John Wiley & Sons: 203–222
- Shaw J.P., Chuang N., Yee H., Shamamian P. 2003. Polymorphonuclear neutrophils promote rfgf-2-induced angiogenesis *in vivo*. *Journal of Surgical Research*, 109: 37–42
- Staton A. C., Reed W. R.M., Brown N. J. 2009. A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays *International Journal of Experimental Pathology*, 90: 195–221
- Sun X.T., Ding Y.T., Yan X.G. 2004. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an *in vitro* quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World Journal of Gastroenterology*, 10: 2524–2528
- Szweykowska-Kulińska Z., Jarmolowski A., Figlerowicz M. 2003. RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression. *Acta Biochimica Polonica*, 50, 1: 217–229

- Tabata M., Kondo M., Haruta Y., Seon B.K. 1999. Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in SCID mice using (125)I-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *International Journal of Cancer*, 82, 5: 737–42
- Tannock I. F., Hill R. P., Bristow, G. R., Harrington, L. 2005. *The Basic Science of Oncology*. Fourth edition, New Baskerville, The McGraw-Hill Companies: 123–133, 349–375, 455
- Taraboletti G., Roberts D., Liotta L.A., Giavazzi R. 1990. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *The Journal of Cell Biology*, 111: 765–772
- Teissie, J., Escoffre, J. M., Rols, M. P., Golzio, M. 2008. Time dependence of electric field effects on cell membranes. A review for a critical selection of pulse duration for therapeutical applications. *Radiology and Oncology*, 42, 4: 196–206
- ten Dijke P., Goumans M.J., Pardali E. 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 11, 1: 79–89
- Tsujie M, Uneda S, Tsai H, Seon BK. 2006. Effective anti-angiogenic therapy of established tumors in mice by naked anti-human endoglin (CD105) antibody: differences in growth rate and therapeutic response between tumors growing at different sites. *International Journal of Oncology*, 29, 5: 1087–1094
- Vanneman M., Dranoff G. 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, 12: 237–251
- Veranič P., Romih R., Pšeničnik M. 2003. *Praktični pouk celične biologije*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 23–24
- Vogelstein B., Kinzler W. K. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10, 789–799
- Wang D., Stockard C. R., Harkins L., Lott P., Salih C., Yuan K., Buchsbaum D., Hashim A., Zayzafoon M., Hardy R., Hameed O., Grizzle W., Siegal G. P. 2008. Immunohistochemistry for the evaluation of angiogenesis in tumor xenografts. *Biotechnic and Histochemistry*, 83, 3: 179–189
- Wemme H., Pfeifer S., Heck R., Muller-Quernheim J. 1992. Measurement of lymphocyte proliferation: critical analysis of radioactive and photometric methods. *Immunobiology*, 185: 78–89.

- Wester K., Asplund A., Bäckvall H., Micke P., Derveniece A., Hartmane I., Malmström P., Pontén F. 2003. Zinc-based fixative improves preservation of genomic dna and proteins in histoprocessing of human tissues. *Laboratory Investigation*, 83: 889–899
- Whitehead K.A., Langer R., Anderson D. G. 2009. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8, 2: 129–38
- Yamamoto T., Kozawa O., Tanabe K., Akamatsu S., Matsuno H., Dohi S., Uematsu T. 2001. Involvement of p38 MAP kinase in TGF-beta-stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells. *Journal of Cell Biochemistry*, 82, 4: 591–598
- Yuan F., Salehi H.A., Boucher Y., Vasthare U.S., Tuma R.F., Jain R.K. 1994. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Research*, 54: 4564–4568
- Zetter B.R. 1987. Assay of capillary endothelial cell migration. *Methods in Enzymology*. 147: 135–144
- Zhang Y., Satterlee A., Huang L. 2012. *In Vivo* Gene Delivery by Nonviral Vectors: Overcoming Hurdles?. *Molecular Therapy*, 20, 7: 1298–1304
- Zijlstra A., Seandel M., Kupriyanova T.A. 2006. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood*, 107: 317–327

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Maji Čemažar za neprecenljiv trud, koristne nasvete, vzpodbudne besede ter neizmerno pomoč kot pri laboratorijskem delu tudi pri izdelavi magistrskega dela. Najlepša hvala za uvodne korake v čudoviti svet znanosti.

Prof. dr. Andreju Coeru se zahvaljujem za ves čas podarjen v laboratorijske učne ure, neprestano razpoložljivost, koristne nasvete ter neprecenljivo pomoč.

Članoma komisije, prof. dr. Roku Konstanjšku ter prof. dr. Kristini Sepčič se zahvaljujem za prilagodljivost, hiter in temeljit pregled magistrskega dela ter koristne nasvete.

Najlepša hvala dr. Juliji Hmeljak za najboljše vzdušje v laboratoriju, vse kavice in koristne nasvete. Tanji Dolinšek in Boštjanu Markelcu se zahvaljujem za vso pomoč in podporo. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim članom iz Oddelka za eksperimentalno onkologijo ter iz Fakultete za vede o zdravju za popestritev laboratorijskega dela.

Posebna zahvala gre mag. Elen Slavec za vse nasvete, dobro voljo in odlično lektoriranje.

Hvala vsem prijateljem in sošolcem, posebno Katarini in Simonu, za nepozabne dogodivščine, neprecenljive spomine in leta smeha.

Moji družini, očetu Darkotu, mami Ivanki ter sestrama Bernardi in Eriki se iz srca zahvaljujem za vso podporo, konstruktivne kritike, pomoč in obilo ljubezni. Hvala za topel objem in varno zatočišče.

Mojemu Andražku se toplo zahvaljujem za vse skupne trenutke, bodrilne besede in neizmerno ljubezen. Hvala tudi za vso pomoč in podporo.